



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Detecção da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) em fluido oral de homens que fazem sexo com homens (HSH) da região da Grande Lisboa

Cláudia Andreia Figueiredo Coroa

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

(OUTUBRO, 2015)



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Detecção da infecção pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) em fluido oral de homens que fazem sexo com homens (HSH) da região da Grande Lisboa

Autor: Cláudia Andreia Figueiredo Coroa

Orientador: Prof. Doutor João Piedade

Co-orientador: Prof.^a Doutora Sónia F. Dias

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Biomédicas

Este trabalho contou com o apoio financeiro da Comissão Europeia (Programa de Saúde Pública 2008-2013), no âmbito do projecto europeu SIALON II – “Capacity building in combining targeted prevention with meaningful HIV surveillance among men who have sex with men”, e da Fundação para a Ciência e a Tecnologia, no âmbito da Unidade de Parasitologia e Microbiologia Médicas (UPMM).

Esta dissertação não foi redigida segundo o novo Acordo Ortográfico (de 1990).

Agradecimentos

Ao Professor João Piedade, o meu sincero agradecimento por toda a aprendizagem que me proporcionou assim como o apoio, a atenção, a compreensão, a força de vontade e a inspiração que me transmitiu ao longo deste período de trabalho em conjunto.

À Professora Sónia Dias, por toda a disponibilidade no fornecimento das amostras bem como dos dados característicos da população, sendo uma mais-valia na realização deste estudo.

À Ângela, pela simpatia, orientação e esclarecimento no laboratório.

Aos meus pais, pelo incentivo, pelo apoio, e por sempre terem acreditado em mim, ao longo de todo o percurso.

Aos meus padrinhos, por todo o amor e palavras de estímulo que sempre tiveram para mim.

À Sílvia Pereira, Flávia Ribeiro e Carla Tavares, minhas colegas de Mestrado, companheiras e amigas, pela partilha tanto dos momentos de ansiedade como os de alegria e de realização pessoal.

Aos amigos de sempre, estando perto mesmo que longe, por toda a compreensão, carinho e pelo incentivo constante em ultrapassar todos os obstáculos durante este caminho.

O meu muito obrigada!

Resumo

Segundo as estimativas do Programa Conjunto das Nações Unidas para o HIV/sida, o número de pessoas infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), no final de 2014, era de 36,9 milhões. Em termos de prevenção, o grupo dos homens que fazem sexo com homens (HSH) constitui um alvo primordial de intervenção, considerando as taxas elevadas de transmissão do HIV, associadas a comportamentos sexuais de risco. A incidência da infecção nos HSH tem vindo a aumentar nos últimos anos, nos países ocidentais, incluindo Portugal. Um dos entraves ao diagnóstico da infecção e à implementação de programas eficazes de vigilância consiste no facto destes implicarem, frequentemente, a utilização de um método invasivo, a colheita de sangue, pelo que têm sido apresentadas novas opções, baseadas em amostras biológicas alternativas, como o fluido oral.

Para a realização deste estudo de vigilância epidemiológica, no âmbito do projecto europeu SIALON II, escolheu-se como população alvo indivíduos do sexo masculino que reportam a prática de actividades sexuais com indivíduos do mesmo sexo, realizando-se 409 colheitas de amostras de fluido oral na área da Grande Lisboa. A pesquisa de anticorpos anti-HIV baseou-se num algoritmo de teste com recurso à utilização sequencial de dois testes imunoenzimáticos de naturezas distintas. Nas amostras inicialmente negativas, ou com resultados discrepantes, procedeu-se à quantificação de IgGs totais no fluido oral, de modo a validar a sua qualidade. Foram excluídas 37 amostras por conterem um teor de IgGs inferior ao limiar estabelecido, ficando então a amostra de trabalho com 372 amostras de fluido oral. Destas, 69 foram consideradas positivas, obtendo-se assim uma taxa de detecção de anticorpos anti-HIV em amostras de fluido oral de HSH da Grande Lisboa de 18,5%.

Com o intuito de efectuar a amplificação do DNA proviral do HIV-1 eventualmente presente nas células colhidas com o fluido oral, maioritariamente queratinócitos da mucosa oral, recorreu-se a uma *nested*-PCR para amplificar um fragmento de 650 pb da região codificante da transcriptase reversa, no gene *pol*, realizando-se em seguida uma clonagem em vector plasmídico, antes da sequenciação nucleotídica. Nas 69 amostras testadas, obteve-se apenas três produtos de amplificação, aparentemente específicos. Os resultados da pesquisa de regiões de semelhança local contra as sequências depositadas nas bases de dados internacionais não confirmaram, no entanto, a presença de DNA proviral do HIV-1 nestas amostras, correspondendo antes a DNA genómico de bactérias da flora comensal humana dos géneros *Streptococcus*, *Leptotrichia* e *Capnocytophaga*. Não foram encontradas, portanto, quaisquer amostras de fluido oral positivas para a presença de DNA proviral do HIV-1. Não se pode descartar a hipótese destas células não se encontrarem efectivamente infectadas, não suportando uma infecção pelo HIV, o que continua a ser controverso na literatura.

A estratégia experimental seguida é, seguramente, adequada para a implementação de estudos de vigilância e monitorização de tendências evolutivas da epidemia pelo HIV, dada a maior adesão dos indivíduos para a colheita de fluido oral, comparativamente ao sangue, podendo ser aplicada a grupos populacionais de difícil acesso, como os HSH, trabalhadores do sexo ou utilizadores de drogas por via endovenosa.

Palavras-Chave: vírus da imunodeficiência humana (HIV); homens que fazem sexo com homens (HSH); fluido oral; vigilância epidemiológica do HIV.

ABSTRACT

According to the estimates by the Joint United Nations Program on HIV/AIDS (UNAIDS), the number of people infected with the human immunodeficiency virus (HIV) at the end of 2014 was 36.9 million. In terms of prevention, the group of men who have sex with men (MSM) is a major target for intervention, given the high rates of HIV transmission associated with high-risk sexual behavior. The incidence of HIV infection in MSM has increased in recent years in Western countries, including Portugal. One of the barriers to a more universal access to diagnostics and to the implementation of effective surveillance programs is the fact that these frequently involve the use of an invasive method, at blood collection, and so new options based on alternative biological samples, such as oral fluid, have been put forward.

For this surveillance study, under the scope of the European project SIALON II, a target population of adult males who report engaging in sexual activities with other males was chosen, and 409 oral fluid samples were collected at the Greater Lisbon. The detection of anti-HIV antibodies was based on a test algorithm including the sequential use of two different enzyme immunoassays, used as screening and confirmatory tests. In the samples with initially negative or conflicting results, the quantification of total IgG was performed, used as an indicator of specimen quality. As 37 samples were excluded from the study because of an IgG content under the accepted threshold (<3.5 mg/L), a total of 372 samples of oral fluid was validated. Of these, 69 were considered positive for the presence of anti-HIV antibodies, which translates in a detection rate of 18.5%.

In order to carry out the amplification of HIV-1 proviral DNA if present in the cells collected along with the oral fluid (presumably, mainly keratinocytes of the oral mucosa), a nested-PCR protocol was set up to amplify a 650 bp-fragment of the reverse transcriptase coding region, at the *pol* gene. From all the 69 samples tested, only three yielded an apparently specific amplification product that was cloned into a plasmid vector before nucleotide sequencing. The results from the search for regions of local similarity between our sequences and the ones deposited in international databases do not confirm, however, the presence of HIV-1 proviral DNA in these cells, matching instead the genomic DNA of human oral commensal bacteria from the genera *Streptococcus*, *Leptotrichia* and *Capnocytophaga*. Summing up, no oral fluid samples positive for the presence of HIV-1 proviral DNA have been found. However, one cannot rule out that these cells are actually not infected or not supporting a productive HIV infection, which remains controversial in the literature.

The experimental strategy adopted in this study is certainly suitable for the implementation of studies of surveillance and monitoring of evolutionary trends of the HIV epidemic, given the greater adherence to the collection of oral fluid when compared to blood, and may be applied to hard-to-reach and hidden populations for HIV surveillance, such as MSM, sex workers or intravenous drug users.

Keywords: human immunodeficiency virus (HIV); men who have sex with men (MSM); oral fluid; HIV surveillance.

ÍNDICE

1. Introdução.....	1
1.1. Síndrome da Imunodeficiência Adquirida	1
1.2. Origem Biológica, Taxonomia e Classificação do HIV.....	1
1.3. Estrutura da Partícula Viral e do Genoma do HIV-1	5
1.4. Ciclo Replicativo do HIV-1	7
1.5. Aspectos Epidemiológicos da Pandemia e Prevalência do HIV em Homens que Fazem Sexo com Homens.....	11
1.6. A Utilização de Fluido Oral no Diagnóstico da Infecção pelo HIV	17
2. Objectivos.....	21
3. Material e Métodos.....	22
3.1. Amostra Populacional	22
3.2. Colheita e Processamento das Amostras de Fluido Oral	22
3.3. Detecção de Anticorpos Anti-HIV.....	24
3.4. Doseamento de IgGs nas Amostras de Fluido Oral	26
3.5. Extracção e Purificação de DNA das Amostras de Fluido Oral	27
3.6. Amplificação por nested-PCR.....	28
3.6.1. Primers e Região Alvo.....	28
3.6.2. Protocolo Experimental	30
3.7. Observação dos Fragmentos de DNA Amplificados	32
3.8. Clonagem dos Produtos de PCR	33
3.8.1. Vector Plasmídico pGEM [®] -T Easy	33
3.8.2. Procedimentos de Clonagem	34
3.8.2.1. Ligação dos Fragmento de DNA ao Vector Plasmídico	34
3.8.2.2. Preparação de Células Bacterianas Competentes e Transformação	34
3.8.2.3. Selecção de Clones Bacterianos	35

3.8.2.4. Extracção do DNA Plasmídico.....	36
3.8.2.5. Selecção de Moléculas de DNA Plasmídico para Confirmação da Clonagem.....	37
3.8.2.6. Hidrólise do DNA Plasmídico com EcoRI.....	37
3.9. Extracção e Purificação de DNA Plasmídico para Sequenciação Nucleotídica	37
3.10. Sequenciação Nucleotídica.....	38
3.11. Análise Bioinformática das Sequências Nucleotídicas	38
4. Resultados.....	39
4.1. Caracterização da População Estudada	39
4.2. Detecção de Anticorpos Anti-HIV no Fluido Oral	41
4.3. Doseamento de IgGs no Fluido Oral.....	44
4.4. Amplificação por nested-PCR.....	45
4.5. Clonagem no Vector Plasmídico pGEM®-T Easy	47
4.5.1. Selecção de Plasmídeos Recombinantes	48
4.6. Análise Bioinformática de Sequências Nucleotídicas.....	50
5. Discussão e Conclusões.....	52
6. Referências Bibliográficas.....	70
7. Anexos.....	85

Lista de Abreviaturas

aa – Aminoácido(s)

ATP – 5'-trifosfato de adenosina (do inglês *adenosine triphosphate*)

AZT – Azidotimidina

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

BSA – Albumina sérica bovina (do inglês *bovine serum albumin*)

CA – Proteína da cápside

CCRN – Receptor de quimiocinas da classe CC (do inglês *CC chemokine receptor n*)

CDC – *Centers for Disease Control and Prevention*

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar (do inglês *complementary deoxyribonucleic acid*)

CD4 – Receptor celular (do inglês *cluster of differentiation type 4*)

CRF – Forma recombinante circulante (do inglês *circulating recombinant form*)

CXCR4 - Receptor de quimiocinas da classe CXC (do inglês *CXC chemokine receptor 4*)

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)

DNase – Desoxirribonuclease

dNTP(s) – Desoxirribonucleótido(s)

D.O. – Densidade óptica

DTT – Ditionitreitol

ECDC – *European Centre for Disease Prevention and Control*

EDTA – Etilenodiaminotetracetato

EIA – teste imunoenzimático (do inglês *enzyme immunoassay*)

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay*

env – Gene codificante das glicoproteínas do invólucro viral (do inglês *envelope*)

EUA – Estados Unidos da América

gag – Gene codificante das proteínas da estrutura interna do virião (do inglês *group specific antigen*)

GAT – Grupo Português de Activistas sobre Tratamentos de VIH/SIDA Pedro Santos

gp – Glicoproteína

HIV – Vírus da imunodeficiência humana (do inglês *human immunodeficiency virus*)

HLA – Antígeno leucocitário humano (do inglês *human leukocyte antigen*)

HSH – Homens que fazem sexo com homens

IN – integrase

IPTG – Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

IST – Infecções sexualmente transmissíveis

LB – *Lysogeny broth*

LTR – Regiões repetitivas terminais longas (do inglês *long terminal repeats*)

MA – Proteína da matriz

mg – Miligrama

min – Minuto

ml – Mililitro

mM – Milimolar

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro (do inglês *messenger ribonucleic acid*)

NC – Proteína da nucleocápside

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

nef – Gene acessório do HIV (do inglês *negative factor*)

ng – Nanograma

nm – Nanómetro

NNRTIs – Inibidores não-nucleosídicos da transcriptase reversa (do inglês *non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors*)

NRTIs – Inibidores nucleosídicos da transcriptase reversa (do inglês *nucleoside reverse transcriptase inhibitors*)

OMS – Organização Mundial da Saúde

ORF – *Open Reading Frame*

pb – Par(es) de bases

PBS - *Phosphate-buffered saline*

PCR – Reacção em cadeia da polimerase (do inglês *polymerase chain reaction*)

PEG – Polietilenoglicol

PIC – Complexo de pré-integração (do inglês *pre-integration complex*)

pmol – Picomoles

pol – Gene codificante das proteínas enzimáticas do HIV (do inglês *polymerase*)

PR – protease

p/v – Peso por volume

rev – Gene regulador do HIV (do inglês *regulator of expression of viral proteins*)

RNA – Ácido ribonucleico (do inglês *ribonucleic acid*)

RNase – Ribonuclease

rpm – Revoluções por minuto

RRE – *Rev responsive element*

RT – Transcriptase reversa (do inglês *reverse transcriptase*)

SDS – Dodecil sulfato de sódio (do inglês *sodium dodecyl sulphate*)

seg – Segundo

sida – Síndrome da imunodeficiência adquirida

SIV – Vírus da imunodeficiência símia (do inglês *simian immunodeficiency virus*)

SU – Glicoproteína de superfície

T_A – Temperatura de hibridação (do inglês *annealing temperature*)

TAE – Tampão Tris-Acetato-EDTA

TAR – *Transactivation response element*

tat – Gene regulador do HIV (do inglês *transcriptional transactivator*)

TEG – Tampão Tris-EDTA-Glicose

TM – Glicoproteína transmembranar

T_M – Temperatura de desnaturação (do inglês *melting temperature*)

TSS – Solução de transformação e armazenamento (do inglês *Transformation and Storage Solution*)

UNAIDS – Programa Conjunto das Nações Unidas para o HIV/sida

URF – Forma recombinante única (do inglês *unique recombinant form*)

V – Volt

vif – Gene acessório do HIV (do inglês *viral infectivity factor*)

vpr – Gene acessório do HIV (do inglês *viral protein R*)

vpu – Gene acessório do HIV-1 (do inglês *viral protein U*)

v/v – Volume por volume

x g – Força centrífuga relativa à aceleração gravitacional terrestre

X-Gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-tiogalactopiranósido

λ – Comprimento de onda

μ g – Micrograma

μ l – Microlitro

°C – Grau Celsius

1. Introdução

1.1. Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

Em 1981, foi reportado ao CDC (do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*), nos Estados Unidos da América, o aparecimento de vários indivíduos com infecções oportunistas generalizadas e patologias raras, com acentuada linfopenia, como uma extensa candidíase das mucosas, pneumonia causada por *Pneumocystis jirovecii* e infecção por citomegalovírus, muitas vezes com subsequente aparecimento de sarcoma de Kaposi (CDC, 1981a, b; Gottlieb et al., 1981). Estas patologias foram inicialmente descritas em homens que fazem sexo com homens (HSH), previamente saudáveis, existindo, de imediato, a suspeita de se tratar de uma doença transmissível por via sexual. Um número crescente de novos casos, em diferentes grupos de risco (e.g. indivíduos utilizadores de drogas injectáveis), conduziu à caracterização de uma nova entidade clínica, que o CDC denominou síndrome da imunodeficiência adquirida (sida) (CDC, 1982). Em 1983, foi identificado o vírus da imunodeficiência humana (HIV, do inglês *human immunodeficiency virus*) como o agente etiológico da sida (Barré-Sinoussi et al., 1983), apresentando como principal característica a depleção dos linfócitos T CD4+ (do inglês *cluster of differentiation type 4*), o que conduz a uma disfunção progressiva da acção do sistema imunitário. Mais tarde, já em 1986, foi isolado um segundo vírus associado à sida, com relevância específica nos países da África Ocidental (Clavel et al., 1986).

1.2. Origem Biológica, Taxonomia e Classificação do HIV

A sida é causada por dois lentivírus, HIV-1 e HIV-2, sendo ambos resultado de transmissões de carácter zoonótico a partir de estirpes distintas de vírus da imunodeficiência símia (SIV, do inglês *simian immunodeficiency virus*) que infectam naturalmente primatas africanos (Sharp e Hahn, 2010, 2011). Esta teoria é sustentada por fortes evidências de natureza genética, filogenética, geográfica e epidemiológica – Fig. 1 (Hahn et al., 2000; Keele et al., 2006).

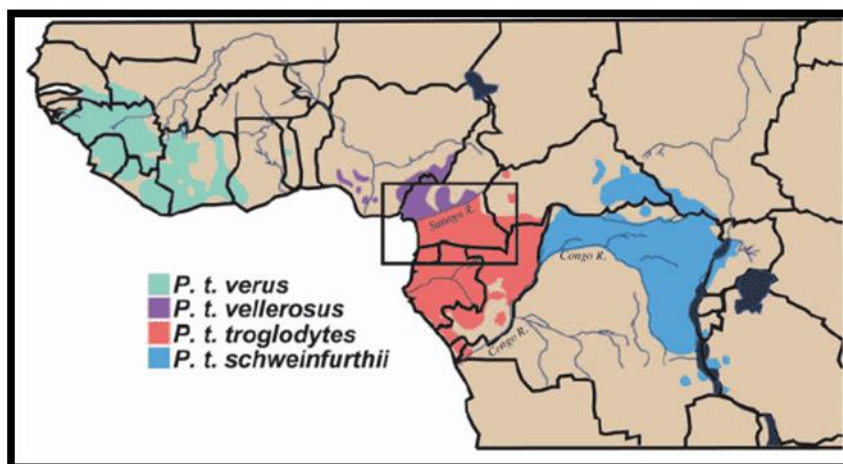


Fig. 1 - Mapa da África Central com a representação da distribuição geográfica das subespécies de chimpanzés relacionadas com a origem do HIV-1 (adaptado de Keele et al., 2006).

O SIV dos chimpanzés da subespécie *Pan troglodytes troglodytes* (SIVcpzPtt) apresenta uma relação filogenética muito próxima com o HIV-1, enquanto que o ancestral mais próximo do HIV-2 parece ser o SIV dos mangabeis fuliginosos da espécie *Cercocebus atys* (SIVsm) (Hirsch et al., 1989; Huet et al., 1990). Diversos estudos propuseram que os chimpanzés, por sua vez, terão adquirido o SIV através de outras espécies de primatas, no contexto da predação para efeitos de alimentação (Sharp e Hahn, 2010, 2011).

Relativamente à classificação dos dois tipos de vírus da imunodeficiência humana, pertencem à família *Retroviridae*, subfamília *Orthoretrovirinae*, género *Lentivirus* e grupo dos Lentivírus dos Primatas. O seu genoma é de RNA (do inglês *ribonucleic acid*) e apresentam duas características essenciais relativamente à sua replicação e transcrição nas células hospedeiras. Em primeiro lugar, estão dependentes da actividade da transcriptase reversa viral para efectuar a conversão das moléculas de RNA genómico de cadeia simples em moléculas de DNA (do inglês *deoxyribonucleic acid*) complementar de cadeia dupla. Por outro lado, estão dependentes da actividade de uma integrase viral para a integração do seu genoma, na forma de cDNA, no genoma da célula hospedeira, dando origem ao DNA proviral (Butler et al., 2007).

A diversidade genética elevada é uma característica fundamental do HIV-1 e vários factores têm contribuído para a geração rápida de novas variantes genéticas, à escala mundial. Numerosos estudos de filogenia permitiram classificar o HIV-1 em grupos, subtipos, sub-subtipos e formas recombinantes, de acordo com as sequências genómicas virais e o grau de diferença entre elas (Buonaguro et al., 2007). As estirpes de HIV-1 são classificadas em quatro grupos, M, N, O e P, geneticamente muito diferentes entre si, sendo que os três últimos são raros. O grupo M é o principal responsável pela pandemia e é o que engloba a maior diversidade genética. Para aprofundar mais sobre a transmissão destes vírus para o Homem, foram realizadas várias análises filogenéticas dos vírus dos primatas infectados, permitindo descobrir as origens biológicas mais prováveis dos vírus humanos (Sharp e Hahn, 2010, 2011). Assim, estima-se que os quatro grupos do HIV-1 correspondam a quatro eventos distintos de transmissão cruzada para a nossa espécie, a partir de chimpanzés infectados da subespécie *Pan troglodytes troglodytes*.

O grupo M do HIV-1 compreende nove subtipos genéticos, A-D, F-H, J e K, baseando-se em linhagens monofiléticas consistentes e apresentando uma variabilidade nucleotídica inter-subtipo aproximada entre 10% a 12% para o gene *pol*, 15% a 22% para o gene *gag* e 20% a 30% para o gene *env* (Geretti, 2006). Por sua vez, existem subtipos que apresentam uma diversidade genética intra-subtipo tão elevada que foram subdivididos em sub-subtipos (e.g. A1 a A4 e F1 e F2) (Butler et al., 2007).

A circulação desta diversidade de subtipos de HIV-1 favorece a ocorrência de episódios de co-infecção, o que, considerando as características deste vírus, conduz, muito frequentemente, ao aparecimento de vírus com genoma mosaico, i.e., recombinantes (Buonaguro et al., 2007). Em termos epidemiológicos, os vírus recombinantes são denominados de duas formas distintas. As formas recombinantes circulantes (CRF, do inglês *circulating recombinant forms*) são vírus com genoma mosaico que se propagaram já de modo epidémico, com, pelo menos, três genomas completos, ou quase completos, sequenciados, com origem em indivíduos não relacionados do ponto de vista epidemiológico. Enquanto as formas recombinantes únicas (URF, do inglês *unique recombinant forms*) se referem a vírus com genoma

mosaico identificados num único indivíduo ou grupo de indivíduos relacionados epidemiologicamente (Butler et al., 2007; Buonaguro et al., 2007).

A maior diversidade de formas genéticas do HIV-1 é encontrada na África Centro-Occidental (Fig. 2), onde circulam praticamente todos os subtipos, enquanto na África Meridional e Oriental prevalecem os subtipos C e A (Butler et al., 2007). Quanto à Ásia, o panorama é mais heterogéneo, havendo predominância da CRF01_AE no Sudeste Asiático (em países como a Tailândia e o Vietname), do subtipo B no Japão e Coreia do Sul, do subtipo C no subcontinente indiano, enquanto na China circulam três formas genéticas principais (B, CRF01_AE e CRF07_BC). Por outro lado, no continente americano, o subtipo B é claramente predominante nas regiões Norte e Central. Já na América do Sul, especialmente na região meridional, assiste-se à co-circulação dos subtipos B e F (e diversas formas recombinantes BF). Contudo, é de referir que no Brasil, uma parte considerável das infecções é devida ao subtipo C. Na Europa, o subtipo B é o principal responsável pela epidemia, representando cerca de 80% dos casos de infecção, havendo, no entanto, notáveis excepções, entre as quais, Portugal, Roménia ou os países do Báltico. Em Portugal, a epidemia é muito heterogénea e estima-se que mais de dois terços dos casos de infecção se encontrem associados a subtipos não-B, com clara predominância do subtipo G (Esteves et al., 2002, 2003; Palma et al., 2007).

Relativamente ao HIV-2, este é classificado em oito grupos diferentes (A-H), dos quais A e B são responsáveis pela grande maioria dos casos identificados. (Butler et al., 2007; Hemelaar, 2012) Apenas recentemente foi descrita a primeira forma recombinante circulante de HIV-2, a HIV-2_CRF01_AB (Ibe et al., 2010).

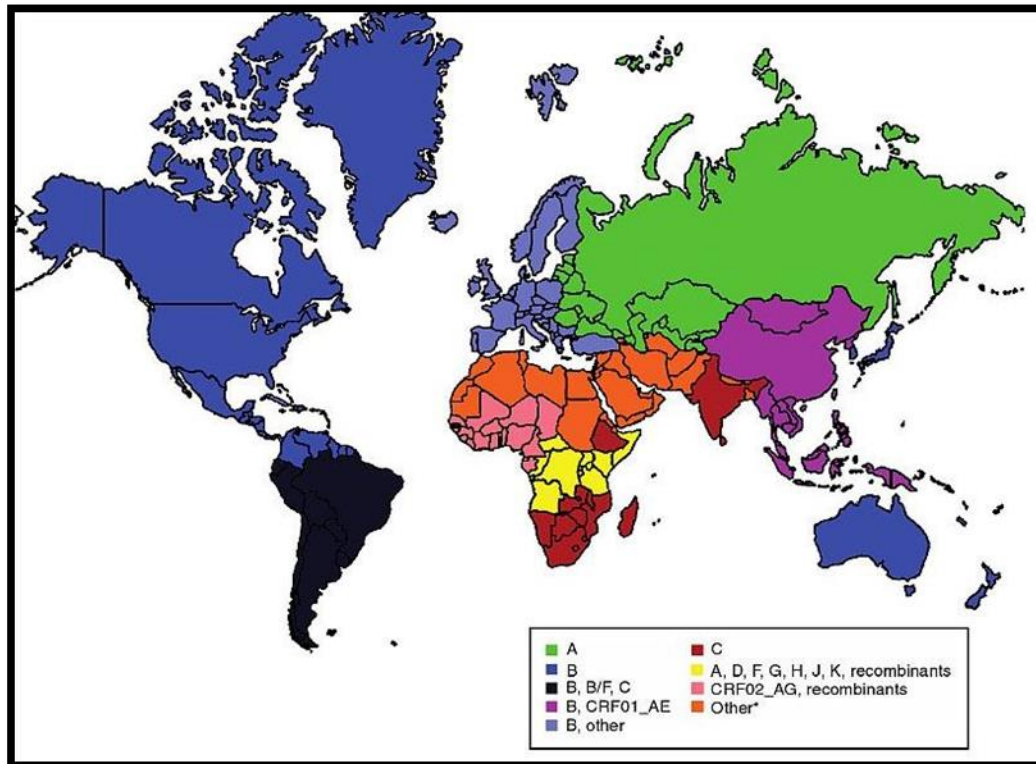


Fig. 2 - Distribuição geográfica mundial dos subtipos de HIV-1, até ao ano de 2009 (adaptado de Chan e Kantor, 2009).

1.3. Estrutura da Partícula Viral e do Genoma do HIV-1

As partículas virais maduras do HIV-1 (Fig. 3) apresentam uma morfologia esférica com, aproximadamente, 110 nm de diâmetro. São revestidas por um invólucro fosfolipídico, intimamente associado a uma matriz proteica que envolve uma cápside em forma de cone truncado. Esta encerra duas moléculas de RNA genómico, protegidas pela proteína da nucleocápside. O virião transporta ainda moléculas da protease viral (PR),

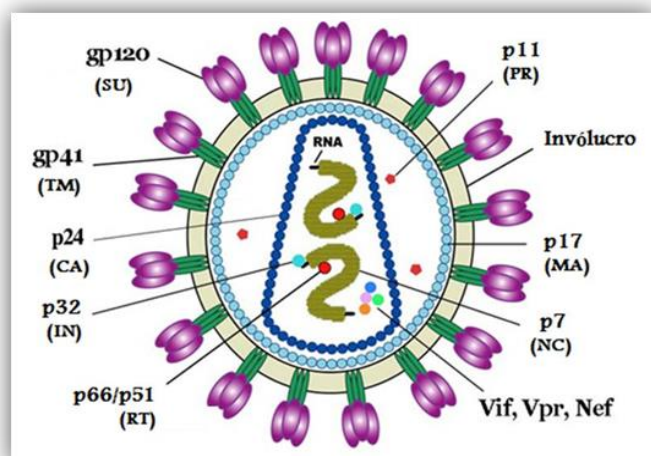


Fig. 3 - Esquema ilustrativo da estrutura de um virião do HIV-1 (adaptado de <http://www.eenzyme.com/HIVResearchTools-2.aspx>)

da transcriptase reversa (RT) e da integrase (IN), para além de algumas proteínas acessórias (Sierra et al., 2005).

O genoma viral é dimérico, característico dos retrovírus, constituído por duas moléculas lineares de RNA, de cerca de 9,5 kb, de cadeia simples e com polaridade positiva. Na sua forma proviral, apresenta duas regiões terminais não codificantes, responsáveis pelo início e regulação da transcrição do genoma – repetições terminais longas (LTR, do inglês *long terminal repeat*) – e contém uma região central codificante que compreende três conjuntos de genes: estruturais - *gag*, *pol* e *env*; reguladores - *tat* e *rev*; e acessórios - *nef*, *vif*, *vpr* e *vpu* (Fig. 4) (Freed, 2001).

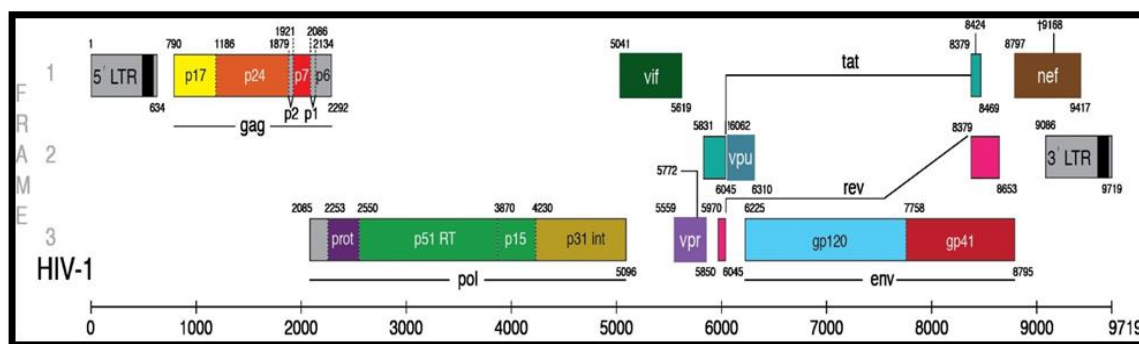


Fig. 4 - Esquema da organização genómica do HIV-1 (disponível em http://hivsystemsbiology.org/wiki/index.php/File:Lentiviral_genetic_maps.png).

O gene *gag* codifica a proteína precursora Pr55^{Gag} que, no final do ciclo replicativo, é clivada pela protease viral (PR/p11), imprescindível na maturação das partículas do vírus. Aquela origina várias proteínas maduras, com funções maioritariamente estruturais, nomeadamente, as proteínas da matriz (MA/p17), cápside (CA/p24) e nucleocápside (NC/p7), bem como ainda a proteína p6, responsável pela regulação da saída dos viriões da célula. Relativamente ao gene *pol*, este codifica as enzimas virais (PR, RT e IN), as quais são inicialmente traduzidas na forma da poliproteína precursora Pr160^{Gag-Pol}. Quanto ao gene *env*, este codifica a glicoproteína precursora, a qual, após sofrer clivagem por acção de proteases celulares, origina a glicoproteína de superfície (SU/gp120) e transmembranar (TM/gp41). A gp120 apresenta cinco regiões conservadas (C1-C5) e cinco variáveis (V1-V5), e, situando-se à superfície externa da partícula viral, tem como função a ligação aos receptores e co-

receptores das células-alvo, aquando da adsorção. Por outro lado, a gp41 é composta por três domínios principais (ectodomínio, sequência de âncora transmembranar e cauda citoplasmática), contendo ainda um domínio fusogénico que permite a fusão do invólucro viral com a membrana celular, durante a entrada (Freed, 2001; Sierra et al., 2005).

Os genes reguladores codificam as proteínas Tat, que induz o aumento da actividade da RNA polimerase II celular, essencial na transcrição viral, e Rev, proteína responsável pelo transporte de alguns RNAs virais do núcleo para o citoplasma das células infectadas.

Quanto aos genes acessórios, *vif* apresenta um papel fundamental na replicação viral, pois a proteína que codifica (Vif/p23) permite a infecção eficiente de células que, à partida, seriam não permissivas, como o exemplo das células mononucleadas do sangue periférico (Ribeiro et al., 2005). Por outro lado, *nef* codifica a proteína Nef/p27, que induz uma alteração na regulação da expressão de CD4 e MHC-I, modificando o estado de activação celular, sendo o principal factor que impede a apoptose, contribuindo para a progressão da infecção. Vpu/p16, codificada pelo gene *vpu*, induz a degradação de CD4, aumentando a libertação de novas partículas virais das células infectadas. Por último, Vpr/p15, codificada por *vpr*, participa no transporte do complexo de pré-integração para o núcleo da célula infectada e induz a paragem do ciclo celular na fase G2, promovendo uma replicação viral constante (Longo et al., 2012).

1.4. Ciclo Replicativo do HIV-1

A fase inicial do ciclo replicativo ocorre com a ligação dos viriões à superfície da célula hospedeira, através da interacção entre domínios extracelulares da gp120 e o receptor celular CD4 (Fig. 5). Os principais alvos celulares do HIV são os linfócitos T CD4+, as células dendríticas e os macrófagos, células que expressam o receptor CD4 à sua superfície. A ligação simples a CD4 não é suficiente para explicar a fusão do invólucro lipídico do vírus com a membrana celular, e a consequente entrada do vírus na célula, bem como o tropismo variável para os diferentes tipos de células CD4+. Foram identificados isolados virais com tropismo preferencial para macrófagos

primários ou para linfócitos T activados (Gartner et al., 1986). Este tropismo diferencial foi posteriormente explicado pela descoberta da utilização de co-receptores distintos, por diferentes estirpes virais: os receptores de quimiocinas CCR5 e CXCR4 (Deng et al., 1996; Feng et al., 1996). As estirpes com tropismo preferencial para macrófagos e linfócitos T utilizam, respectivamente, os co-receptores CCR5 e CXCR4 (Alkhatib et al., 1996; Feng et al., 1996). Com base no co-receptor utilizado, foi desenvolvida uma nova classificação para o HIV-1 (Berger et al., 1998): estirpes R5, as que utilizam o co-receptor CCR5; estirpes X4, as que utilizam o co-receptor CXCR4; e estirpes R5/X4, as que conseguem utilizar ambos (tropismo duplo). Das populações virais que apresentam estirpes R5 e X4, em simultâneo, diz-se que têm tropismo misto. Existem ainda estirpes de HIV, mais frequentes no HIV-2, que utilizam co-receptores alternativos (Berger et al., 1998).

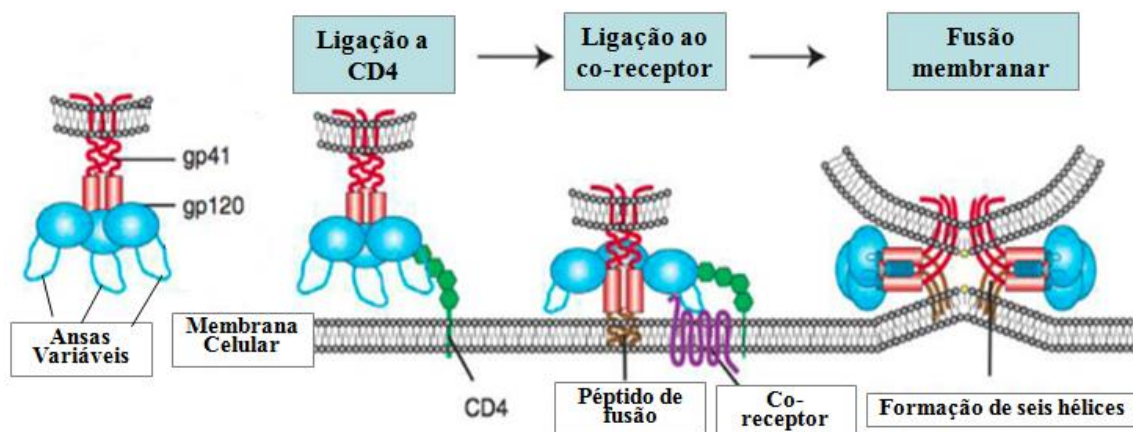


Fig. 5 - Representação esquemática das fases iniciais da entrada do HIV-1 na célula hospedeira (adaptado de http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-1-4614-0980-9_10).

Após a ligação da gp120 a CD4, aquela sofre modificações estruturais que conduzem à exposição de um domínio específico capaz de se ligar aos receptores de quimiocinas, promovendo uma ligação mais estável à célula hospedeira. Esta primeira ligação vai permitir que um péptido fusogénico hidrofóbico, localizado na extremidade amino-terminal da gp41, penetre na membrana da célula-alvo, aproximando o invólucro viral e a membrana celular, permitindo a fusão das duas membranas e a entrada da cápside viral na célula (Freed, 2001).

Em seguida, ocorre a descapsidação, ou seja, eliminação parcial da cápside viral e exposição dos complexos ribonucleoproteicos do genoma (Freed, 2001; Sierra et al., 2005), dando início à fase da transcrição reversa. Esta consiste, fundamentalmente, numa conversão do RNA genómico viral em DNA complementar, de dupla cadeia, por acção da RT. A síntese ocorre no sentido 5'-3', ao longo do RNA, gerando, numa fase inicial, cadeias híbridas, nas quais a porção de RNA é posteriormente degradada por acção de uma actividade de RNase H da própria RT. No final, gera-se uma molécula de DNA de cadeia dupla, que irá ser transportada para o núcleo da célula hospedeira, como parte integrante do chamado complexo de pré-integração (PIC, do inglês *pre-integration complex*). Esta etapa é também suportada pela presença de outras proteínas virais e celulares no PIC (Miller et al., 1997), permitindo a passagem através dos poros do invólucro nuclear e posterior integração do DNA no genoma da célula, dando origem ao provírus. Esta integração é dependente da actividade da enzima integrase, presente no PIC, constituindo um passo fundamental do ciclo replicativo do HIV (Suzuki e Craigie, 2007).

A transcrição viral inicia-se a partir da LTR 5', sendo que a sua região U3 contém elementos que permitem a ligação da RNA polimerase II celular ao DNA proviral. A transcrição dos genes virais é dependente da interacção de inúmeros factores de transcrição de origem celular, entre os quais o factor de transcrição NF- κ B (do inglês *nuclear factor κ B*), com a região 5' LTR. A síntese basal dos RNAs mensageiros (mRNAs) virais é inicialmente bastante baixa, sendo produzidos apenas os transcritos que sofrem *splicing* múltiplo, os quais codificam as proteínas reguladoras Tat e Rev e a proteína acessória Nef. O aumento da actividade transcricional da RNA polimerase II está dependente da acumulação da proteína transactivadora viral Tat e da sua ligação à região TAR (do inglês *transactivation response region*), localizada na extremidade 5' dos RNAs virais. Esta etapa conduz à passagem para uma fase posterior do ciclo replicativo, na qual se assiste à produção de mais duas classes principais de mRNAs virais: os que não sofreram *splicing*, associados à síntese de Pr55^{Gag} e Pr160^{Gag-Pol}, e os que resultam de *splicing* parcial, contendo informação para a tradução de Vpr, Vif, Vpu e gp160. À medida que aumenta a taxa de transcrição, dá-se uma acumulação da proteína reguladora Rev, necessária para o transporte destes transcritos que não sofrem *splicing* ou só o sofrem de modo parcial (bem como, mais tarde, dos próprios genomas

virais), sendo um intermediário de ligação entre os mRNAs virais e as proteínas celulares de transporte nuclear. Esta proteína associa-se à estrutura RRE (do inglês *Rev responsive element*), presente na região *env* dos mRNAs parcialmente ou não processados, permitindo a tradução das proteínas de expressão tardia (codificadas pelos genes estruturais e acessórios).

A montagem das novas partículas virais ocorre ao nível da membrana celular, sendo coordenada por Gag e nela intervindo vários factores de origem celular (o domínio MA de Gag sofre uma transição conformacional na sua extremidade para que se consiga justapor à membrana plasmática, favorecendo a sua ligação). No final da montagem, a libertação das partículas virais ocorre por gemulação, processo no qual intervêm as proteínas virais p6^{Gag} e Vpu. Em simultâneo com a saída, ou imediatamente após, a partícula viral inicia o processo de maturação final, por actividade da PR viral. O processamento proteolítico dos precursores Pr55^{Gag} e Pr160^{Gag-Pol} vai dar origem às proteínas estruturais e enzimáticas da partícula viral madura (e infecciosa). As glicoproteínas do invólucro seguem uma via diferente de maturação. A gp160 apresenta uma conformação multimérica e é transportada para a superfície celular através da via secretora, sendo clivada por uma protease celular (furina) para originar os trímeros de complexos heterodiméricos de gp120 e gp41 (Freed, 2001) (Fig. 6).

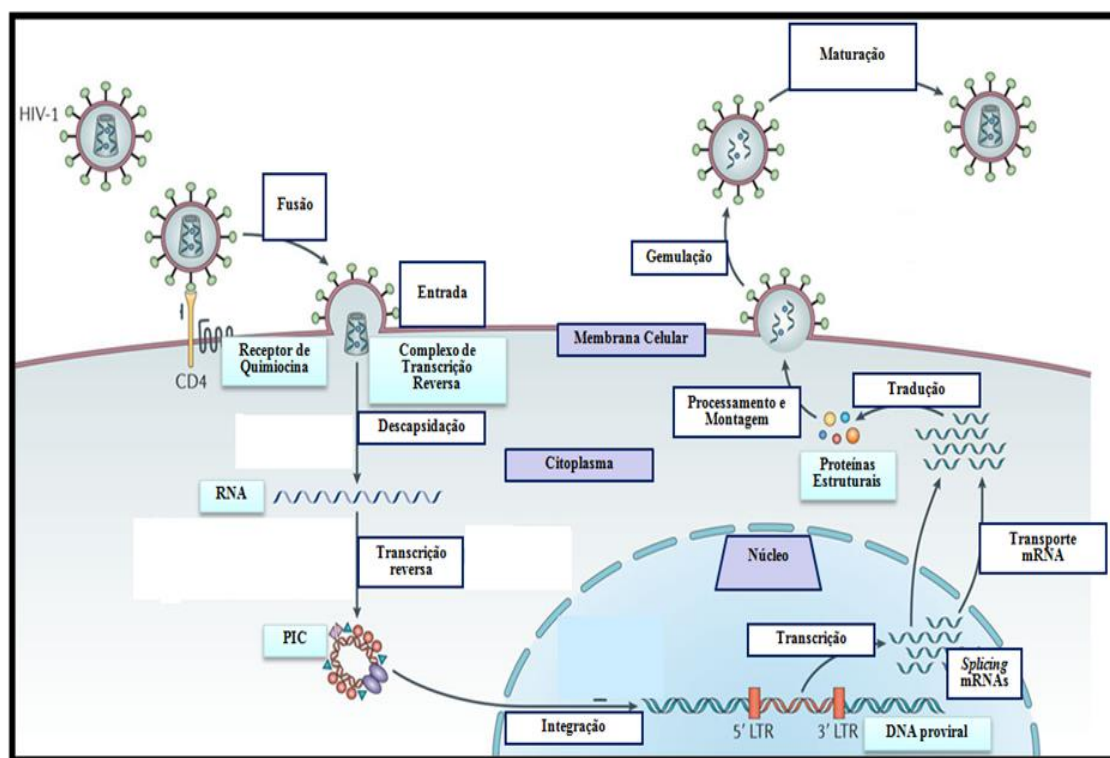


Fig. 6 - Esquema ilustrativo do ciclo replicativo do HIV-1 (adaptado de http://www.nature.com/nrmicro/journal/v11/n12/fig_tab/nrmicro3132_F2.html).

1.5. Aspectos Epidemiológicos da Pandemia e Prevalência do HIV em Homens que Fazem Sexo com Homens

Segundo as estimativas do Programa Conjunto das Nações Unidas para o HIV/sida (UNAIDS) (em http://www.unaids.org/.../20150714_FS_MDG6_Report_e), o número total de pessoas infectadas pelo HIV, no final de 2014, era de 36,9 milhões. Estima-se que no mesmo ano ocorreram cerca de 2 milhões de novas infecções e que 1,2 milhões de indivíduos morreram por causas relacionadas com a sida. O maior número de indivíduos infectados com o HIV concentra-se fundamentalmente no continente africano, principalmente na região subsariana. Esta região continua a mais afectada, com um número estimado de 25,8 milhões de indivíduos infectados. Embora a situação em África tenha vindo a melhorar (o número de novas infecções decresceu cerca de 41%, desde o ano 2000), ainda assim esta região contribui com cerca de dois terços do número total de novas infecções. À escala global, o número de novas

infecções tem vindo a baixar consistentemente desde o ano 2000 (descida de 35%), incluindo entre as crianças, nas quais se tem assistido a um decréscimo ainda superior (na ordem dos 60%). Também o número de óbitos relacionados com a sida sofreu uma descida de 42%, desde o seu máximo em 2004. Estas tendências reflectirão o sucesso relativo das políticas de prevenção que têm vindo a ser implementadas, bem como um acesso cada vez mais facilitado à terapia anti-retroviral (em Março de 2015, estimava-se que 15 milhões de infectados tinham já acesso à terapia).

À escala regional, a maior prevalência da infecção pelo HIV é identificada na África subsariana, onde aproximadamente um em cada 20 adultos está infectado com o vírus. Estima-se ainda que cerca de 80% de todas as mulheres infectadas pelo HIV vivam na África subsariana. A principal via de transmissão nesta região é a heterossexual, contribuindo para estes números a elevada vulnerabilidade e risco de infecção entre as adolescentes e mulheres jovens africanas. Relativamente a outras regiões do mundo, mais homens estão infectados do que mulheres, reflectindo, em parte, o facto das epidemias nesses países serem principalmente entre grupos populacionais específicos, como, profissionais do sexo e seus clientes (alguns deles migrantes), homens que fazem sexo com homens (HSH), utilizadores de drogas injectáveis e indivíduos transexuais (The GAP Report, UNAIDS, 2014). O termo HSH, surgido em 1992, descreve um grupo populacional que tem como principais características o género masculino e a escolha de práticas sexuais, sendo actualmente caracterizado por homens que já tiveram contacto sexual com outro homem, traduzindo o comportamento sexual, independentemente da forma como os homens interpretam e classificam a sua identidade sexual (Schramm et al., 1999; Desai et al., 2015). Em 2012, foi reportado que o grupo de HSH é o que apresenta uma maior incidência e prevalência de infecção pelo HIV, a nível mundial. Estima-se que, nos EUA, a prevalência nos HSH tenha aumentado 8% desde 2001 até ao ano de 2012 (Beyrer et al., 2012).

É de conhecimento geral que as taxas de infecção pelo HIV continuam a aumentar em países ocidentais, incluindo Portugal. De acordo com um estudo efectuado entre 2011 e 2014 (Meireles et al., 2015a), o grupo constituído por HSH é o que apresenta a maior incidência de infecção por HIV, sendo que o processo de seroconversão ocorre, na maioria dos casos, devido à adopção de comportamentos de

risco, como a realização de sexo anal desprotegido (Meireles et al., 2015a). Verificou-se também que, durante esse período de estudo, os homens que mantinham o mesmo parceiro sexual teriam uma maior probabilidade de adoptar comportamentos de risco, pois apresentavam uma errada percepção de que tinham um menor factor de risco, tendo consequentemente uma maior confiança de que não seriam infectados, condição que contribui para a seroconversão. Neste estudo, os principais marcadores de exposição individual ao HIV assinalados são o número de parceiros sexuais e o uso de drogas injectáveis, factores que devem ser considerados ao nível da prevenção (Meireles et al., 2015a). Em 2013, registou-se um aumento significativo no número de diagnósticos efectuados a HSH, sendo este grupo populacional responsável por uma fatia de 43% dos novos casos diagnosticados com HIV, realçando a urgente necessidade de intervenção neste grupo (Martins et al., 2014). No cômputo geral, mais de metade dos novos casos de infecção em 2013 foram descritos na região de Lisboa (Fig. 7).

Região NUTS II	Nº casos	%
Lisboa (PT17)	574	54,0
Norte (PT11)	221	20,8
Centro (PT16)	165	15,5
Algarve (PT15)	52	4,9
Alentejo (PT18)	29	2,7
Madeira (PT30)	17	1,6
Açores (PT20)	5	0,5

Fig. 7 - Distribuição por área de residência de novos casos de infecção por HIV (n=1063), com idade igual ou superior a 15 anos, diagnosticados em 2013. (para 26 casos não há informação disponível)
(fonte: Martins et. al, 2014)

Entre os anos de 2000 e 2012, em Portugal, houve ainda um decréscimo nos casos de sida, aproximadamente 7,4%. Segundo o Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (INSA), os novos casos de diagnóstico em 2013 foram predominantemente em adultos, com idades próximas de 40 anos, do sexo masculino, residentes na região da grande Lisboa (Fig. 7), com elevada proporção de HSH. Quanto ao estágio da infecção, em cerca de 62% dos casos diagnosticados, os indivíduos eram

assintomáticos, com maior probabilidade de transmissão do HIV (Martins et. al, 2014). Por várias razões, as estimativas de prevalência da infecção pelo HIV no grupo de HSH devem ser considerada com precaução (Marcus et al., 2012).

Uma das estratégias utilizadas para controlar a pandemia de infecção por HIV ao longo dos últimos anos tem sido a implementação de campanhas de sensibilização para que se efectue o diagnóstico o mais precocemente possível, de modo a aplicar-se o tratamento e a profilaxia adequados para prevenir uma posterior transmissão do vírus. Estima-se que os indivíduos sem conhecimento de serem portadores do vírus tenham uma taxa de transmissão 3,5 vezes superior aos que conhecem o seu estatuto serológico (Parisi et al., 2013). De acordo com dados estatísticos recentes, aproximadamente um terço dos indivíduos infectados na União Europeia, e um em cada cinco nos EUA, desconhecem que são portadores do vírus (Parisi et al., 2013). Este facto é particularmente relevante em grupos populacionais tradicionalmente associados a elevadas taxas de transmissão, como o exemplo específico dos HSH. Para além de vários aspectos epidemiológicos, logísticos e sociais a considerar, uma das grandes limitações à maior generalização do diagnóstico da infecção pelo HIV tem estado associada com os métodos utilizados, nomeadamente, a colheita de amostras biológicas através de procedimentos invasivos (Schramm et al., 1999; USDHHS, 2014).

Em termos de prevenção, o grupo de HSH constitui um alvo primordial de intervenção, considerando as taxas relativamente elevadas de transmissão do HIV nesta população, associadas a um número elevado de parceiros sexuais, tanto do sexo masculino, como por vezes também do feminino, o que aumenta o risco de transmissão pelos comportamentos sexuais de risco (Vanden Berghe et al., 2011; Xu et al., 2013). Qualquer programa específico de prevenção da infecção por HIV deve ser baseado num conhecimento prévio dos padrões epidemiológicos do grupo populacional a que irá ser aplicado, passando necessariamente pelo conhecimento das taxas de infecção, que poderão ser estimadas através da implementação de programas específicos de vigilância epidemiológica.

Relativamente ao grupo de HSH, encontra-se representado na Fig. 8 o mapa europeu com a prevalência estimada de infecção pelo HIV, entre 2011 e 2013, baseado em dados reportados pela ECDC e OMS (ECDC/OMS, 2014).

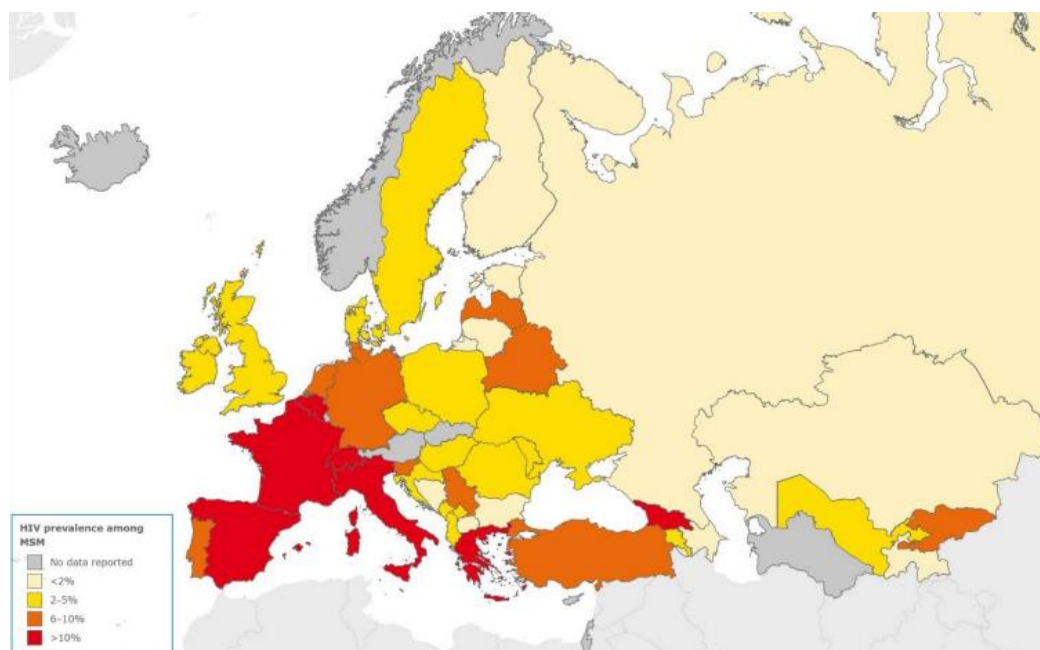


Fig. 8 – Prevalência estimada da infecção pelo HIV em HSH, entre 2011 e 2013, na Europa (fonte: ECDC/OMS, 2014).

Enquanto a incidência da infecção pelo HIV na população geral se encontra em declínio na maior parte do mundo, a incidência entre HSH parece estar a aumentar em várias regiões como na Europa e na Ásia. Neste último continente, o modo de transmissão associado aos HSH é um dos principais contribuintes para a epidemia em vários países. As últimas estimativas apontavam para que os HSH sejam 19 vezes mais propensos a estar infectados com o HIV, comparativamente à restante população (Beyrer et al., 2012). Em 2008, relativamente ao ano de 2004, na União Europeia (UE) e no Espaço Económico Europeu, houve um aumento de 19% no número de casos de transmissão de HIV associados ao contacto sexual entre HSH. Quanto à predominância de transmissão em 2008, foram notificados cerca de 40% dos casos por contacto entre HSH, seguido por contacto heterossexual (29%) e, por fim, a utilização de drogas injectáveis, que ocorre em cerca de 6% dos indivíduos infectados (Fig. 9) (Laar e Likatavicius, 2009).

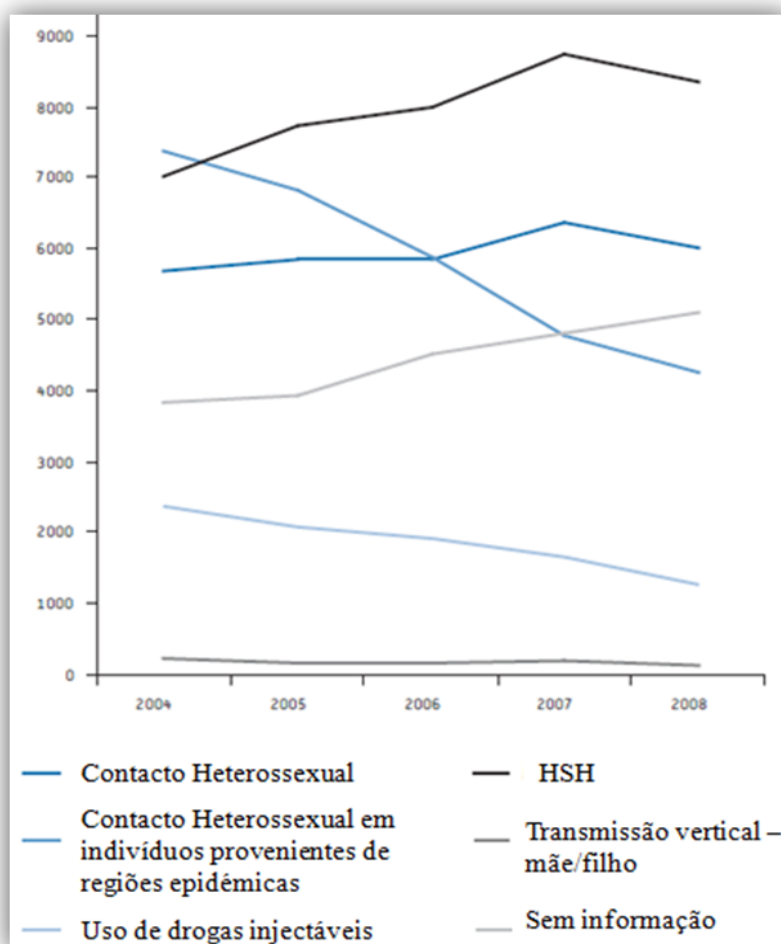


Fig. 9 - Principais causas de transmissão de HIV, entre os anos de 2004 e 2008, na União Europeia (UE) e no Espaço Económico Europeu (adaptado de Laar e Likatavicius, 2009).

Tendo em conta o quadro epidemiológico mundial associado à infecção pelo HIV, é notória a necessidade de aplicação de medidas e estratégias de controlo do número de novos casos de infecção, em especial, em populações particulares, de difícil acesso, com práticas de risco. Para isso, deveria apostar-se num diagnóstico precoce, através da implementação de programas de prevenção e rastreio culturalmente apropriados e acessíveis a uma população diversificada, bem como introduzi-los numa faixa etária mais jovem, pois um diagnóstico tardio, associado à idade avançada do indivíduo, são os principais preditores da mortalidade (Desai et al., 2015).

1.6. A Utilização de Fluido Oral no Diagnóstico da Infecção pelo HIV

Convencionalmente, em indivíduos com idade superior a dois anos, o diagnóstico da infecção pelo HIV é efectuado após colheita de uma amostra de sangue por punção venosa, para obtenção de soro ou plasma. De acordo com a OMS, existem dois algoritmos que podem ser utilizados no diagnóstico de HIV, consoante os testes aplicados (OMS, 1997). O algoritmo clássico envolve um elevado investimento financeiro e inclui dois ensaios. Numa primeira fase, efectua-se um ensaio imunoenzimático (EIA) do tipo ELISA, com uma sensibilidade próxima de 100% e uma especificidade de cerca de 98%. Numa segunda fase, utiliza-se o *Western-blot*, para uma confirmação do resultado obtido no teste anteriormente realizado, que consiste na interpretação dos resultados através de uma tira constituída por antígenos de HIV que irão ligar-se aos anticorpos presentes no soro do indivíduo em estudo, caso seja um resultado positivo, traduzindo-se no aparecimento de bandas coloridas na respectiva tira. A OMS definiu como critério de positividade o aparecimento de um mínimo de duas bandas correspondentes às glicoproteínas em estudo (gp41, gp120 ou gp160), com ou sem bandas de Gag ou Pol. Por outro lado, uma tira sem bandas seria classificada como um resultado negativo (OMS, 1997). No caso de um resultado indeterminado, deve-se repetir uma nova colheita de amostra de sangue, no mínimo após duas semanas, pois o indivíduo pode estar em período de seroconversão. O outro algoritmo, denominado de alternativo, apresenta custos menores, sendo baseado na combinação de até três EIA diferentes entre si, sendo a sua selecção baseada nos objectivos do procedimento (OMS, 1997).

A utilização de colheita de sangue para a realização de diagnóstico e no âmbito de rastreios de prevenção da infecção por HIV também está associada a alguns inconvenientes, como o facto de ser necessário o manuseamento de agulhas, material cortante possivelmente contaminado, o que aumenta os riscos para os profissionais de saúde, tanto no acto da punção venosa, como na eliminação de agulhas, podendo também existir acidentes de trabalho com cortes devido a tubos de vidro partidos contaminados na área laboratorial, tendo em conta que a carga viral contida numa amostra de sangue é relativamente elevada (Tamashiro e Constantine, 1994).

Portanto, com o objectivo de se apostar em métodos de diagnóstico que permitam uma maior adesão por parte dos indivíduos, essencialmente os que constituem os principais grupos de risco de infecção por HIV, tem-se explorado a detecção de anticorpos recorrendo-se ao fluido oral como amostra. É um dos produtos biológicos no qual, recentemente, têm sido efectuadas inúmeras investigações, de forma a testar-se as taxas de sucesso com a sua aplicação, em comparação com resultados obtidos com sangue, produto biológico convencionalmente utilizado (Pink et al., 2009). A utilização de fluido oral, envolve um procedimento que apresenta diversas vantagens, entre as quais, uma colheita não invasiva, ou seja, indolor, menores custos e menor interferência com questões culturais, pois em algumas culturas não é permitida a punção venosa, aparentando ser mais adequado para que haja a sua integração em novos programas de prevenção e rastreio do HIV e, conseqüentemente, existir uma maior taxa de aceitação por parte dos indivíduos a testar (Mirandola et al., 2009; Pink et al., 2009). Também do ponto de vista dos profissionais de saúde, seria uma mais-valia pelo facto de não ser necessário o manuseamento de produtos biológicos contaminados, visto a colheita de fluido oral ser efectuada na sua maioria por material absorvente, como o exemplo de uma esponja, o que evita a utilização de materiais cortantes, facilitando similarmemente o rastreio em grupos onde as colheitas de sangue são mais difíceis como na população dependente de drogas injectáveis (Martinez et al., 1999; Tamashiro e Constantine, 1994).

O fluido oral foi utilizado pela primeira vez como amostra biológica para a detecção de anticorpos anti-HIV por Archibald et al. (1986a, b) e Parry et al. (1987). Este tipo de amostra requer cuidados específicos na sua colheita, pois tanto o volume, como a natureza da amostra obtida, podem ser muito variáveis, sendo necessário assegurar uma quantidade mínima da amostra, em termos de concentração de imunoglobulinas do tipo G (IgG) – Fig. 10 (Hodinka et al., 1998; Malamud e Chavez, 2011; Granade et al., 1998).



Fig. 10 - Colheita de amostra de fluido oral
(disponível em http://www.pocd.com.au/img/drug-testing/Oralscan-Drug-testing_02.jpg).

Actualmente, a saliva e o fluido oral têm sido testados no âmbito do diagnóstico, em diferentes áreas como o da infecção por HIV, patologias malignas e doenças cardiovasculares, contribuindo para a evolução ao nível da medicina (Pink et al., 2009).

No entanto, é importante diferenciar os conceitos de saliva e fluido oral, definindo as características de cada um deles pois apresentam diferenças bastante relevantes e determinantes neste estudo, visto uma colheita efectuada de modo incorrecto contribua para resultados erróneos. A primeira é mais viscosa, produzida pelas glândulas salivares, contendo bactérias, leucócitos, essencialmente macrófagos, mucina e células, e a principal classe de anticorpos detectada é a IgA, sendo, contudo, igualmente secretado um baixo nível de IgG. Quanto ao fluido oral, este corresponde a um transudado da mucosa oral, sendo essencialmente constituído pelo fluido dos capilares da parte inferior da mucosa bucal, entre os dentes e a gengiva, e contendo, para além de IgA, também IgG e IgM, provenientes do plasma. Embora a sua concentração de IgG seja menor do que no plasma, é em maior quantidade do que na saliva (Quadro 1), pelo que o objectivo é a colheita do fluido oral, através do transudado da mucosa oral (Tamashiro e Constantine, 1994; Martinez et al., 1999; Hodinka et al., 1998; Pink et al., 2009; Malamud e Chavez, 2011; Wood et al., 2013).

Fluidos	IgG (mg/L)	IgM (mg/L)	IgA (mg/L)
Plasma	14730	1280	2860
Transudado da Mucosa Oral (Fluido Oral)	3500	230	1110
Saliva	14,4	2,1	19,4

Quadro 1 - Média da concentração de diferentes tipos de imunoglobulinas em diversos fluidos corporais (adaptado de Mortimer e Parry, 1991; Tamashiro e Constantine, 1994).

A transmissão do HIV pode ocorrer devido ao contacto com diversos fluidos corporais que podem conter, quer as próprias partículas virais, quer células infectadas

pelo vírus, tal como sangue, sémen, secreções vaginais e cervicais, secreções rectais e leite materno. Embora o HIV possa igualmente ser detectado em outros fluidos orgânicos, incluindo a saliva, as lágrimas e o líquido cefalorraquidiano, estes, em geral, não representam risco de transmissão. Relativamente ao fluido oral também é possível detectar o vírus, mas em quantidades muito reduzidas, pelo que a sua transmissão por esta via é praticamente nula (Wood et al., 2013). Assim, a transmissão do HIV por via oral apenas está associada, de um modo significativo, a dois tipos de situação: a amamentação natural e o contacto oral-genital durante a relação sexual no adulto (Wood et al., 2013).

A aplicação de fluido oral como amostra biológica para o diagnóstico da infecção pelo HIV já é efectuada há uns anos (Schramm et al., 1999). Por exemplo, em 1994, foi elaborado um estudo demonstrativo de que a utilização de EIA para a detecção de anticorpos anti-HIV em fluido oral apresentava uma sensibilidade entre 95% e 100%, enquanto que ao nível da especificidade manifestava entre 99,5% e 100% (Tamashiro e Constantine, 1994), por comparação com práticas diagnósticas padrão.

Em 2011, os NIH (do inglês *National Institutes of Health*) reportaram a realização de mais de 3 milhões de testes de diagnóstico para o HIV, mundialmente, em que 42% foram efectuados utilizando o algoritmo clássico da OMS e os restantes por testes rápidos. Relativamente ao tipo de amostra, cerca de 7% dos testes denominados convencionais, ou seja, utilização de teste de rastreio de tipo imunoenzimático (ELISA) e teste de confirmação por *Western Blot*, foram efectuados com a utilização de fluido oral, enquanto dos testes rápidos correspondeu a 39% (APHL, 2013).

Através da exploração de novos métodos de diagnóstico, tal como pela utilização do fluido oral, existe um ponto de partida para que com uma maior acessibilidade a rastreios e com um equilíbrio de custos ao nível financeiro, seja possível apostar em programas de prevenção direccionados para os diferentes grupos de risco.

2. Objectivos

Descrevem-se em seguida os objectivos propostos para este estudo:

- ❖ Detectar a infecção pelo HIV, em HSH, na área da Grande Lisboa, com base na pesquisa de anticorpos anti-HIV no fluido oral, utilizando um algoritmo diagnóstico com aplicação de dois testes imunoenzimáticos sucessivos;
- ❖ Testar a qualidade das amostras de fluido oral colhidas em HSH, para detecção de anticorpos anti-HIV, através do doseamento de IgGs totais por ensaio imunoenzimático;
- ❖ Caracterizar geneticamente o HIV circulante em HSH na área da Grande Lisboa, por análise filogenética automatizada de sequências nucleotídicas do gene *pol*, mais especificamente, da região codificante da transcriptase reversa (RT), bem como a presença de polimorfismos genéticos naturais associados à diminuição da susceptibilidade aos anti-retrovirais inibidores da RT.

3. Material e Métodos

3.1. Amostra Populacional

Para a realização deste estudo, escolheu-se como população alvo indivíduos do sexo masculino, maiores de idade, que reportam a prática de actividades sexuais com indivíduos do mesmo sexo (no mínimo uma vez nos últimos 12 meses), vulgarmente designados por “homens que fazem sexo com homens” (HSH). Realizaram-se 409 colheitas de amostras de fluido oral, de HSH da área da Grande Lisboa, tendo todos os indivíduos participantes assinado um termo de consentimento informado, livre e esclarecido para o estudo das suas amostras (Anexo 1). Como locais de colheita foram seleccionados aqueles que apresentavam uma presença mais assídua da população alvo, de modo a obter-se resultados representativos da realidade actual, pelo que se incidiu essencialmente em bares, saunas e discotecas frequentados por HSH na área Metropolitana de Lisboa.

Este estudo foi realizado no âmbito do projecto SIALON II, implementado na União Europeia e em alguns países vizinhos, que tem como objectivo primário a prevenção da infecção pelo HIV, através de uma vigilância epidemiológica recorrendo a amostras de fluido oral para uma maior facilidade de diagnóstico (SIALON II Project, 2013).

3.2. Colheita e Processamento das Amostras de Fluido Oral

A amostra biológica utilizada para a realização deste estudo é o fluido oral. A colheita de fluido oral foi realizada, nos locais seleccionados, através da orientação de técnicos formados para o efeito, recorrendo-se ao dispositivo *Oracol* (*Malvern Medical Developments*, Reino Unido) (Fig. 11). O fluido oral foi colhido, pelos participantes, com recurso a material esterilizado, aberto apenas pelos próprios. O processo de colheita consiste em introduzir uma esponja na cavidade oral, de modo a ser friccionada cerca de trinta vezes para a direita e trinta para a esquerda sobre as gengivas superiores e inferiores, evitando tocar nos dentes, para que seja possível reunir a maior quantidade de amostra possível. Através deste método, obtêm-se secreções com IgA, assim como

IgG e IgM, provenientes do plasma e que são transferidas para a boca, sendo expectável colherem-se aproximadamente entre 0,5 ml e 1,5 ml de amostra por cada participante no estudo (Mortimer e Parry, 1991).



Fig. 11 - Dispositivo utilizado para colheita de fluido oral (disponível em: <http://www.sialon.eu/en/home/>).

O envio das amostras de fluido oral para o laboratório de Virologia da Unidade de Microbiologia Médica do Instituto de Higiene e Medicina Tropical foi realizado durante um período de cerca de quatro meses, compreendido entre Maio e Agosto de 2013. Todas as amostras foram recebidas num período de 72 h após a realização da colheita, tendo sido mantidas à temperatura ambiente (nunca excedendo os 30 °C).

Para o processamento das amostras de fluido oral, adicionou-se primeiramente 1 ml de tampão de recuperação (Anexo 2) ao tubo contendo a haste com a esponja, misturando-se no vórtex durante aproximadamente 20 s. Em seguida, espremeu-se a esponja contra a parede do tubo, para se retirar o máximo de volume de amostra e inverteu-se a haste, colocando novamente dentro do tubo, procedendo-se agora a uma centrifugação durante 5 min, a 900 x g, para extracção do fluido oral. Por fim, fez-se a transferência do fluido oral para microtubos de crioconservação esterilizados de 1,5 ml, em alíquotas de 500 µl, de modo a perfazer um mínimo de dois microtubos com fluido oral por colheita. O sedimento de células (maioritariamente, epiteliais) foi ressuscitado num volume residual de tampão de recuperação e igualmente armazenado num microtubo de crioconservação. Todos os microtubos foram armazenados a -20 °C.

3.3. Detecção de Anticorpos Anti-HIV

O algoritmo clássico para a detecção de anticorpos anti-HIV envolve a realização de dois tipos de testes, um de rastreio e outro de confirmação. Os primeiros devem ser fáceis de realizar e ter uma elevada sensibilidade, ou seja, elevada capacidade de detecção de anticorpos de baixa afeição, minimizando assim a possibilidade de obtenção de resultados falsos negativos. Um dos exemplos mais comuns utilizados como testes de rastreio são os baseados no princípio de ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay* (OMS, 1997).

Para este estudo de pesquisa de anticorpos anti-HIV no fluido oral, aplicou-se o algoritmo da Fig. 12, que se baseia na utilização sequencial de dois tipos de teste ELISA, um de terceira geração – *Genscreen™ HIV-1/2 Version 2* (Bio-Rad, França) – e um de quarta geração – *Vironostika® HIV Ag/Ab* (bioMérieux, França) (Vermoesen et al., 2012; Fransen et al., 2013; SIALON II Project, 2013).

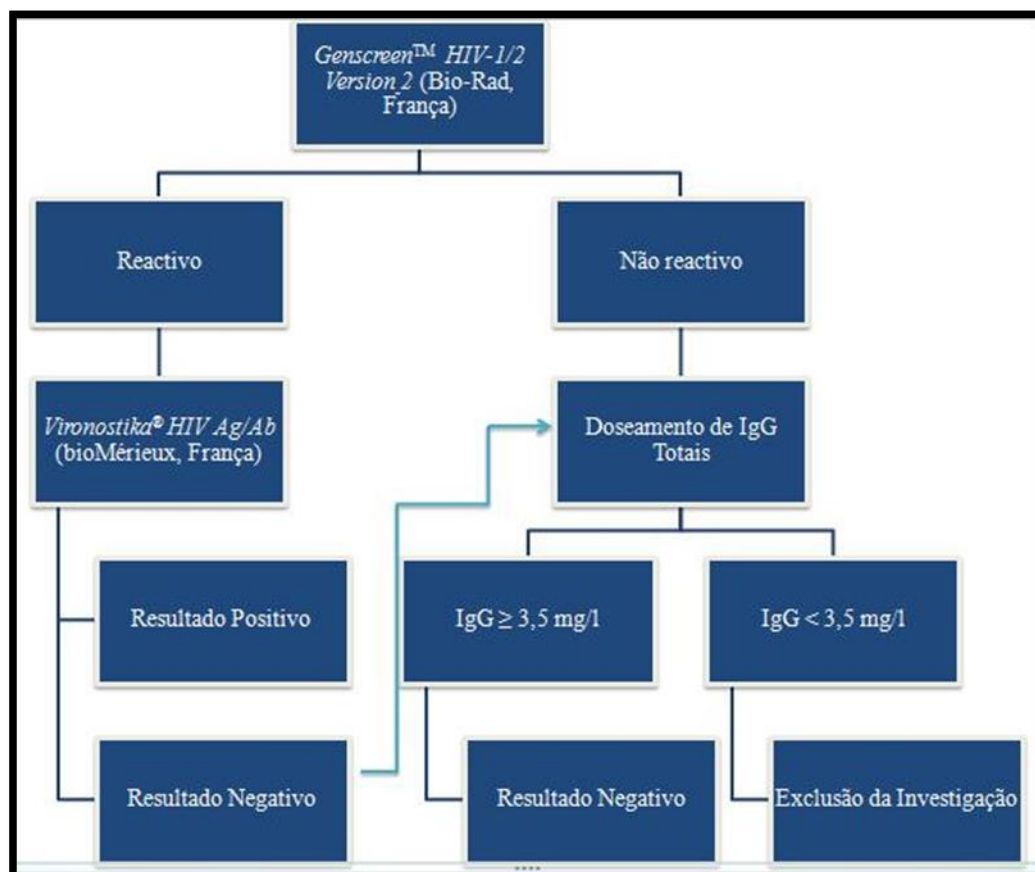


Fig. 12 - Algoritmo utilizado para a detecção de anticorpos anti-HIV nas amostras de fluido oral (Vermoesen et al., 2012; Fransen et al., 2013; SIALON II Project, 2013).

O teste *Genscreen*TM *HIV-1/2 Version 2* (Bio-Rad, França) é um teste imunoenzimático, de tipo “sanduíche”, desenvolvido originalmente para a detecção de anticorpos anti-HIV-1, incluindo do grupo O, e/ou anti-HIV-2 (do tipo IgG, IgM ou IgA), em amostras de soro ou plasma, após a sua adição à microplaca ELISA, onde se encontram antígenos virais purificados imobilizados (as proteínas recombinantes gp160 e p24, do HIV-1, e um péptido que mimetiza um epitopo imunodominante da glicoproteína do envoltório do HIV-2). Segundo o fabricante, este teste tem uma sensibilidade, para a detecção de anticorpos anti-HIV-1 e anti-HIV-2, de 100% e uma especificidade de 99,98%, quando utilizado em amostras de soro ou plasma. Quanto à utilização de fluido oral como amostra biológica, trata-se de um teste com uma sensibilidade de 100% e uma especificidade de 97,6% (Vermoesen et al., 2012; Fransen et al., 2013), daí ter sido seleccionado como teste de rastreio no presente estudo. O protocolo para testar o fluido oral é o mesmo que o utilizado para soro ou plasma (SIALON II Project, 2013), pelo que se seguiram rigorosamente as especificações do fabricante (Anexo 3), incluindo a utilização, em cada teste, de três tipos de controlos distintos (negativo, positivo e de *cut-off*).

Dadas as suas características, um resultado positivo para HIV obtido com um teste imunoenzimático do tipo ELISA deve ser sempre confirmado. Neste trabalho, o teste *Genscreen*TM *HIV-1/2* (Bio-Rad, França) foi utilizado como um teste de rastreio, pelo que todas as amostras inicialmente positivas foram submetidas a um teste de confirmação recorrendo ao teste *Vironostika*[®] *HIV Ag/Ab* (bioMérieux, França), segundo o algoritmo de diagnóstico adoptado (Fig. 12).

O *Vironostika*[®] *HIV Ag/Ab* (bioMérieux, França) é um teste ELISA de quarta geração que apresenta uma sensibilidade de 97,8% e uma especificidade de 100% em amostras de fluido oral (Vermoesen et al., 2012; Fransen et al., 2013). É normalmente utilizado para detectar a presença de anticorpos anti-HIV-1 (do tipo IgG, IgM e IgA), incluindo do grupo O, e anti-HIV-2 e do antígeno p24 de HIV-1 em amostras humanas de soro ou plasma, baseando-se no princípio “sanduíche”. Neste teste, os poços da microplaca de ELISA estão revestidos com gp160 de HIV-1, o péptido ANT70 de HIV-1 do grupo O, um péptido da glicoproteína de superfície gp36 de HIV-2 e um anticorpo monoclonal anti-p24 de HIV-1. De acordo com os resultados de estudos recentes (Fransen et al., 2013), a utilização de amostras de fluido oral com este teste requer a

introdução de duas alterações ao protocolo experimental do fabricante: i) a utilização de um volume duplo de amostra a testar (100 µl de fluido oral vs. 50 µl de soro/plasma); ii) a utilização de uma fórmula adaptada para a determinação do valor de *cut-off* ($CO = \text{valor de absorvância médio dos controlos negativos} + 0,05$). Para além destas adaptações, o protocolo experimental utilizado seguiu rigorosamente as instruções do fabricante (Anexo 4), incluindo a utilização de um controlo negativo (em quatro réplicas) e de três controlos positivos (para anticorpos anti-HIV-1, anti-HIV-2 e antígeno p24 de HIV-1, respectivamente).

3.4. Doseamento de IgGs nas Amostras de Fluido Oral

De acordo com o algoritmo de teste utilizado, sempre que as amostras de fluido oral testadas para a presença de anticorpos anti-HIV se revelavam negativas, ou com resultados discrepantes (Fig. 12), seria obrigatório confirmar-se a sua qualidade, nomeadamente, pela quantificação de IgG totais (SIALON II Project, 2013). Para se determinar a quantidade de IgG presentes nas amostras de fluido oral, utilizou-se um ensaio de imunoperoxidase, em suporte ELISA do tipo “sanduíche” (*Human IgG*, Immunology Consultants Laboratory, Inc., EUA). Este *kit* comercial permite a determinação quantitativa de IgG humanas no soro e outras amostras biológicas (plasma, saliva, urina, fezes), sendo baseado na utilização de anticorpos anti-IgG humanas purificados, de origem caprina, adsorvidos a um suporte ELISA tradicional.

A quantificação das IgG é feita por interpolação a partir de uma curva padrão específica para cada teste, construída com recurso a soluções de IgG de concentração conhecida, compreendida entre 0 e 500 ng/ml. Para a construção da curva padrão foi utilizado o modelo de regressão logístico de quatro parâmetros (modelo 4PL), de acordo com procedimentos padrão. Este modelo não linear é vulgarmente utilizado para ajustamentos de curva em bioensaios ou imunoensaios, tais como ELISA ou radioimunoensaios, ou construção de curvas de dose-resposta. Para a realização dos ensaios, seguiu-se o protocolo fornecido pelo fabricante (Anexo 5), com pequenas adaptações. Antes do ensaio, cada amostra de fluido oral foi diluída 1:250 no tampão de diluição fornecido. Cada amostra foi testada sem duplicado, sendo no entanto retestadas todas as amostras com doseamentos iniciais de IgG de valor até 3,5 mg/L. As amostras

com concentração de IgG total menor do que 3,5 mg/L foram consideradas inválidas e excluídas do estudo (Fig. 12).

3.5. Extracção e Purificação de DNA das Amostras de Fluido Oral

Com o objectivo de extrair e purificar o DNA genómico das células guardadas a -20 °C, obtidas das amostras de fluido oral (ver em 3.2.) de indivíduos considerados positivos para a presença de anticorpos anti-HIV, recorreu-se ao *kit* comercial *NZY Tissue gDNA Isolation Kit* (NZYTech, Portugal). O método utilizado baseia-se na utilização de uma coluna de sílica que permite a adsorção do DNA, anteriormente libertado das células pela utilização de um tampão de lise contendo proteinase K e SDS (do inglês *sodium dodecyl sulphate*), sendo outras impurezas, como proteínas e sais, removidos nas fases de lavagem.

Antes de se iniciar o processo de extracção, descongelou-se rapidamente as células, transferindo-as para um banho a 37 °C durante 30 s. Em seguida, procedeu-se a duas lavagens consecutivas com tampão PBS (do inglês *phosphate-buffered saline*) estéril, pH 7,4, num microtubo, com realização de dois períodos de centrifugação a 2500 x g (*Centrifuge 5415D*, Eppendorf, Alemanha), para eliminar impurezas que pudessem estar presentes, visto ser uma amostra que à partida se encontra com um elevado grau de contaminação.

Em seguida, a uma suspensão celular em 200 µl de tampão de ressuspensão (NT1), adicionou-se 25 µl de solução de proteinase K (~20 mg/ml) e 200 µl de tampão NL, contidos no *kit* de extracção. O conteúdo do microtubo foi misturado no vórtex e fez-se uma incubação a 56 °C, durante 15 min., misturando-se ocasionalmente. Finda a incubação, adicionou-se 210 µl de etanol a 100% (v/v) e misturou-se no vórtex. Transferiu-se a mistura para a coluna de sílica, colocada num microtubo de recolha de 2 ml, e procedeu-se a um passo de centrifugação durante 1 min a 11000 x g. Descartou-se o eluato e colocou-se a coluna de sílica, com o DNA adsorvido, num novo tubo de recolha, iniciando-se a fase de lavagem, pela adição de 500 µl de tampão NW1, centrifugando-se com o procedimento acima descrito. Descartou-se o eluato, sendo feita uma última lavagem, nas mesmas condições, após adição de 600 µl de tampão NW2. O

passo seguinte foi uma secagem adicional da membrana de sílica, centrifugando a coluna no tubo de recolha durante 2 min, a 11000 x g. Iniciou-se então o passo final da eluição do DNA genómico. Nesta última etapa, realizaram-se duas eluições consecutivas (por centrifugação, durante 2 min a 11000 x g), sendo a primeira com 100 µl de tampão NE, incluído no *kit*, e a segunda com o mesmo volume de água estéril, ambos pré-aquecidos a 70 °C. As eluições foram precedidas de 1 min de incubação, à temperatura ambiente, após adição do líquido na coluna de sílica. O DNA eluído foi armazenado a -20 °C, até utilização em experiências de amplificação por PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*).

3.6. Amplificação por *nested*-PCR

3.6.1. *Primers* e Região Alvo

Com o objectivo de realizar a amplificação do DNA proviral do HIV-1 eventualmente existente nas células colhidas com o fluido oral, recorreu-se à técnica de *nested*-PCR, com a utilização de *primers* capazes de amplificar uma região codificante da transcriptase reversa, no gene *pol*, com base no protocolo descrito por Steegen et al. (2006), com adaptações (Videira e Castro, 2010). Para este estudo, utilizaram-se quatro *primers* externos na primeira reacção (Gag2, PR1, RT137 e RT3303) e dois *primers* internos na segunda reacção (RT1 e RT4) (Quadro 2), de modo a obter-se um amplicão final de 650 pb. Estes foram igualmente adaptados de Steegen et al. (2006), com alterações pontuais, introduzidas anteriormente, em Gag2, PR1, RT137 e RT4, como descrito em Videira e Castro (2010), com o objectivo de aumentar o nível de especificidade da reacção de amplificação, mas sem perder sensibilidade. Por outro lado, tendo-se identificado uma maior variabilidade em determinadas posições das regiões de hibridação de certos *primers*, alguns (PR1, RT137, RT3303 e RT4) apresentam degenerações na sua sequência (R=A/G; W=A/T; Y=T/C) (Quadro 2).

Os *primers* foram adquiridos à empresa STAB VIDA (Caparica, Portugal), a qual os disponibiliza liofilizados, sendo hidratados com água ultrapura estéril *Milli-Q* (Reagent Grade Ultrapure Systems, Millipore, EUA) para uma concentração final (*stock*) de 100 pmol/µl, requerendo a sua preparação a utilização de condições de

asepsia, em câmara de fluxo laminar. Para manter a estabilidade dos mesmos, realizaram-se diluições das soluções *stock* de *primers* para soluções de trabalho, a 10 pmol/μl, mantidas a -20 °C.

<i>Primers</i>	Nome do <i>primer</i>	Localização em HXB2 (nt.)	Sequência 5'-3'
1ª Reacção <i>nested</i> - PCR	Gag2	1404-1426	CAATGAGGAAGCTGCAGAATGGG
	PR1	1822-1844	GAAATGATGACAGCATGYCAGGG
	RT137	3301-3325	TTCTGTATRTCATTGACAGTCCAGC
	RT3303	3309-3329	TAAYYTTYTGATRTCATTGAC
2ª Reacção <i>nested</i> - PCR	RT1	2604-2632	CCAAAAGTTAAACAATGGCCATTGACAGA
	RT4	3231-3253	TGGAGTTCATAWCCCATCCAAAG

Quadro 2 - *Primers* utilizados para as duas reacções da *nested*-PCR (a sua localização foi feita com base na anotação do genoma da estirpe de referência HXB2 do subtipo B do HIV-1).

Em suma, para a primeira reacção foram então utilizados quatro *primers* externos, sendo dois directos, Gag2 e PR1, e dois inversos, RT137 e RT3303, originando a amplificação de quatro fragmentos de DNA, com diferentes tamanhos, compreendidos entre 1504 e 1926 pb. Estes são utilizados como matrizes para a segunda etapa, em que vão hibridar com os dois *primers* internos (RT1 e RT4) para amplificação de um fragmento de DNA com o tamanho de 650 pb (Fig. 13).

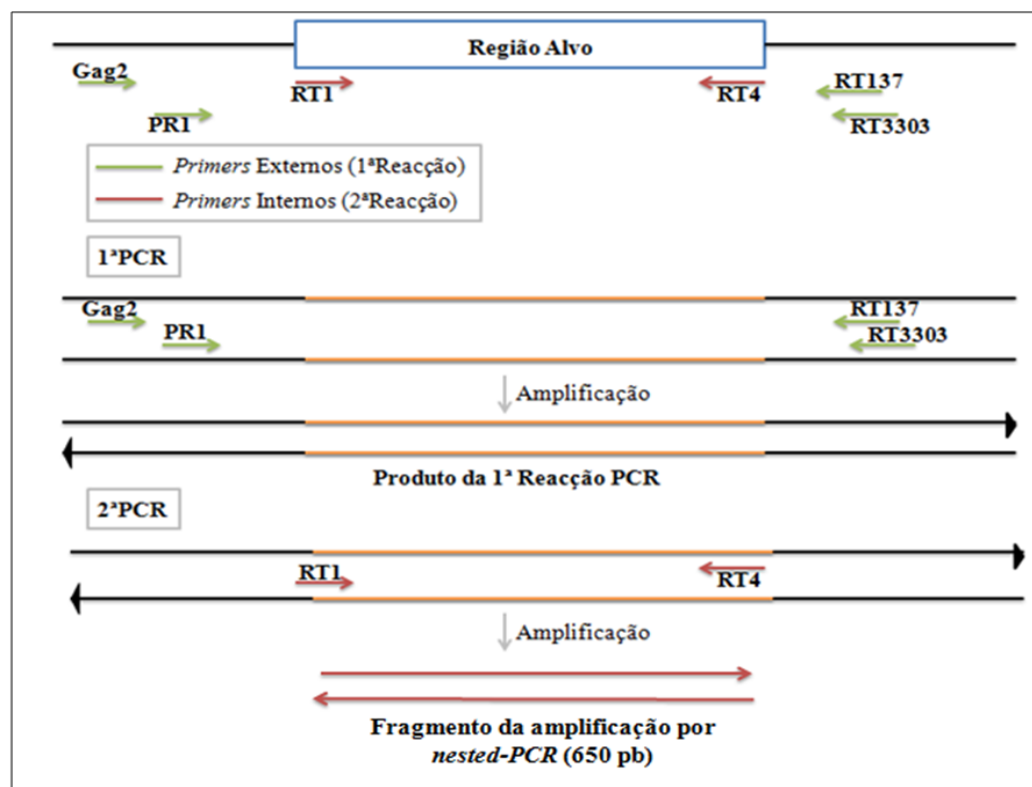


Fig. 13 - Esquema representativo da amplificação, por *nested-PCR*, de uma região de 650 pb da região codificante da transcriptase reversa do gene *pol* de HIV-1.

3.6.2. Protocolo Experimental

Para a realização das reacções de amplificação foi utilizado o sistema comercial, pronto a usar, *NZYTaq 2x Green Master Mix* (NZYTech, Portugal). Este sistema fornece uma mistura de reacção contendo uma forma recombinante modificada da enzima Taq DNA polimerase, purificada de *Escherichia coli*. A solução fornecida contém igualmente os dNTPs (do inglês *deoxyribonucleotide triphosphates*) e $MgCl_2$ (para concentração final de 2,5 mM), sendo apenas necessário adicionar os *primers* e o DNA matriz a amplificar. A Taq DNA polimerase utilizada não possui actividade exonucleásica 3'→5', pelo que os amplicões gerados possuem extremidades protuberantes com adenosina, permitindo a clonagem directa em sistemas apropriados. Este sistema oferece ainda a opção de utilização de uma “solução optimizadora”, desenvolvida para aumentar a sensibilidade e a especificidade da PCR, em amostras de DNA eventualmente contaminadas com inibidores da polimerização.

Para a primeira reacção de amplificação, foi necessário preparar-se uma mistura de reacção, mantida no gelo, no interior da câmara de fluxo laminar, para um volume final de 25 µl, por amostra, constituída por 12,5 µl de *NZYTaq 2x Green Master Mix*, referida anteriormente, 0,5 µl de cada um dos quatro *primers* (concentração final, 0,2 µM cada), 5 µl de reagente optimizador (*NZYTaq 5x Optimizer Solution*, NZYTech, Portugal) e 4,5 µl de água ultrapura estéril *Milli-Q* (Reagent Grade Ultrapure Systems, Millipore, EUA). Posteriormente, noutro compartimento do laboratório, foi realizada a adição do DNA matriz de cada amostra, adicionando-se 1 µl a cada microtubo com a referida mistura de reacção, dando-se início à PCR. Foi utilizado um termociclador *iCycler* (Bio-Rad, EUA), com as condições experimentais descritas no Quadro 3.

Etapas	Número de Ciclos	Temperatura	Tempo
Desnaturação Inicial	1x	95 °C	2 min
Amplificação*	10x	95 °C	30 s
		45 °C	30 s
		72 °C	2 min
	10x	95 °C	30 s
		50 °C	30 s
		72 °C	3 min
	15x	95 °C	30 s
		55 °C	30 s
		72 °C	4 min
Extensão Final	1x	72 °C	8 min
Manutenção	1x	4 °C	∞

Quadro 3 - Descrição das condições da primeira reacção de amplificação de uma região codificante da transcriptase reversa do gene *pol* do HIV-1, através de *nested*-PCR.

*de modo a tentar reduzir a inespecificidade elevada dos primeiros resultados obtidos, testou-se, entre outras hipóteses (ver capítulo Resultados e Discussão), um protocolo de amplificação alternativo de maior restringência. Assim, as duas primeiras fases de amplificação foram fundidas numa só (1ª fase, 15x, 95 °C, 30 s; 50 °C, 30 s; 72 °C, 2 min; 2ª fase, 20x, 95 °C, 30 s; 55 °C, 30 s; 72 °C, 3 min).

Relativamente à segunda PCR, realizou-se uma segunda mistura de reacção, para um volume final de 50 µl, utilizando-se, por amostra, 25 µl de *NZYTaq 2x Green Master Mix*, 1 µl de cada um dos dois *primers* internos (concentração final, 0,2 µM cada), 10 µl do reagente optimizador (*NZYTaq 5x Optimizer Solution*, NZYTech, Portugal) e 11 µl de água ultrapura estéril *Milli-Q* (Reagent Grade Ultrapure Systems, Millipore, EUA). O DNA matriz aplicado na segunda reacção de PCR, como já mencionado, é o produto da primeira reacção, sendo adicionado o volume de 2 µl e aplicado o programa de amplificação com as condições referidas no Quadro 4.

Em cada uma das reacções foi efectuado um controlo de contaminação, ou seja, substituição do DNA matriz por água. Dada a elevada inespecificidade inicial, o protocolo-base foi alvo de algumas experiências de optimização, incluindo, alteração do programa de amplificação (ver nota ao Quadro 3) e/ou a utilização de várias quantidades de DNA matriz para a primeira PCR.

Etapas	Número de Ciclos	Temperatura	Tempo
Desnaturação Inicial	1x	95 °C	3 min
Amplificação	35x	95 °C	30 s
		50 °C	30 s
		72 °C	1 min
Extensão Final	1x	72 °C	7 min
Manutenção	1x	4 °C	∞

Quadro 4 - Descrição das condições da segunda reacção de amplificação de uma região codificante da transcriptase reversa do gene *pol* do HIV-1, através de *nested*-PCR.

3.7. Observação dos Fragmentos de DNA Amplificados

A observação dos fragmentos de DNA obtidos foi efectuada após a realização de electroforese em gel de agarose a 1,5% (p/v), em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 0,5X (Anexo 2), com brometo de etídeo (0,5 µg/ml). Aplicou-se 5 µl de produto de amplificação, sendo o gel sujeito a uma diferença de potencial de 80 V. Como padrão de

migração, utilizou-se o marcador de massa molecular *Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder* (Fermentas, Canadá). Por fim, a visualização dos fragmentos de DNA foi realizada com recurso a radiação ultravioleta ($\lambda=254$ nm), sendo a captação digital de imagem feita pelo equipamento *Gel-Doc XR* (Bio-Rad, EUA).

3.8. Clonagem dos Produtos de PCR

Todos os produtos de PCR obtidos, com o tamanho estimado esperado (~650 pb), apresentavam-se em pequena quantidade e/ou eram acompanhados por algumas bandas inespecíficas, pelo que se recorreu à sua clonagem, após extracção e purificação a partir de gel de agarose, com recurso ao sistema comercial *pGEM®-T Easy Vector* (Promega, EUA).

3.8.1. Vector Plasmídico *pGEM®-T Easy*

O vector plasmídico *pGEM®-T Easy* (Promega, EUA), de 3015 pb (Fig. 14), fornecido já sob a forma linearizada, tem como principal característica o facto das suas extremidades possuírem um resíduo protuberante 3'-timidina, o que permite uma maior

eficácia na ligação aos produtos amplificados por PCR com recurso a uma

enzima com as características da Taq DNA polimerase utilizada (ver secção 3.6.2.). Por outro lado, a presença daqueles resíduos impede a recirculação do vector, aumentando ainda mais a eficiência de ligação.

Este vector apresenta uma região de clonagem múltipla, flanqueada pelos promotores T7 e SP6, inserida no gene do α -péptido da enzima β -galactosidase (*lacZ'*),

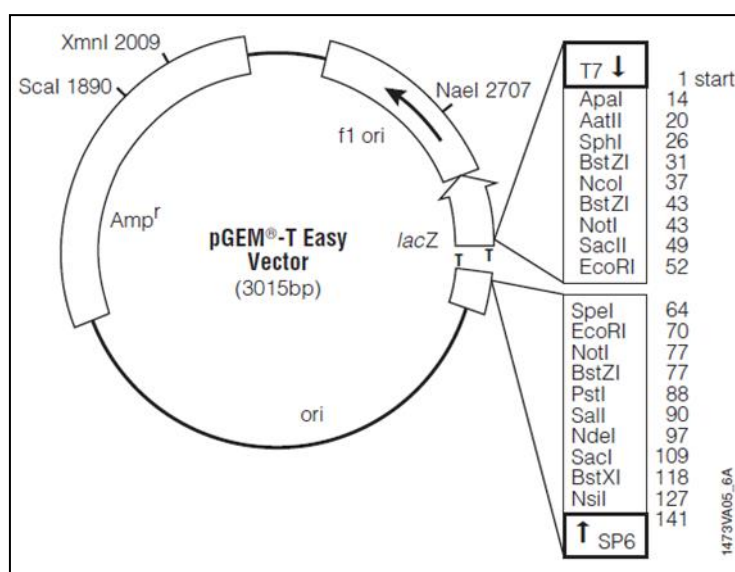


Fig. 14 - Mapa físico do vector plasmídico *pGEM®-T Easy*, com apresentação dos locais de reconhecimento de diversas enzimas de restrição na região de clonagem múltipla e respectivas coordenadas (adaptado de www.promega.com).

o que permite a selecção, em meio de cultura e na estirpe bacteriana apropriados, de clones bacterianos recombinantes, por α -complementação. A consequência deste fenómeno é visível em placas com meio contendo X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) e IPTG (isopropil- β -D-tiogalactopiranosido). O primeiro é uma substância cromogénica que é degradada pela β -galactosidase funcional, ou seja, requerendo um α -péptido igualmente activo, pelo que prováveis clones não recombinantes são traduzidos pelo aparecimento de colónias azuis, na presença de IPTG. A ligação do fragmento de DNA origina, habitualmente, a inactivação do gene *lacZ'*, impedindo que as bactérias produzam β -galactosidase funcional, não ocorrendo, portanto, a degradação do X-gal, na presença de IPTG. A consequência é o aparecimento de colónias de cor branca, sinónimo de prováveis clones bacterianos com moléculas de DNA plasmídico recombinante.

3.8.2. Procedimentos de Clonagem

3.8.2.1. Ligação dos Fragmento de DNA ao Vector Plasmídico

A ligação do fragmento de DNA ao vector plasmídico utilizado requer a preparação de uma mistura de reacção com 5 μ l de tampão de ligação 2X, 1 μ l de solução de vector plasmídico *pGEM[®]-T Easy* (Promega, EUA) (50 ng/ μ l), 1 μ l de ligase de DNA do fago T4 (3 U/ μ l) e 3 μ l do produto amplificado por PCR, para um volume final de 10 μ l. Com o objectivo de se obter uma maior eficiência de ligação, realizou-se a incubação da mistura de ligação, durante a noite, a 4 °C, em banho refrigerado (*Frigiterm*, P-Selecta, Espanha).

3.8.2.2. Preparação de Células Bacterianas Competentes e Transformação

Foi utilizada a estirpe JM109 de *Escherichia coli*, que tem como principais características ser superprodutora do repressor Lac e naturalmente sensível à ampicilina.

Inoculou-se a estirpe JM109 em 3 ml de meio LB líquido (do inglês *lysogeny broth*) (Anexo 2), com agitação contínua, a 220 rpm, durante a noite, a 37 °C. No dia seguinte, fez-se uma diluição 1:100 para meio fresco, sendo retirados 200 μ l de suspensão celular saturada para 20 ml de LB líquido, momento a partir do qual era

efectuada a verificação do crescimento bacteriano por medição de densidade óptica a 600 nm, até se atingir um valor entre 0,3 e 0,5, mantendo as condições de incubação anteriores. Depois, realizou-se uma centrifugação a 4000 rpm (*Centrifuge 5810 R*, Eppendorf, Alemanha), a 4 °C, durante 30 min, para sedimentação das células. Em seguida, dispensou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento celular em 1 ml de meio TSS (do inglês *transformation and storage solution*) frio (Anexo 2).

Para o passo efectivo de transformação, foram adicionados 5 µl da mistura de ligação realizada antecipadamente (ver secção anterior) a 120 µl da suspensão de células competentes de *E. coli* JM109 em meio TSS, com homogeneização suave. Realizou-se o mesmo procedimento para os controlos positivo e negativo, e, em substituição da mistura de ligação, adicionou-se, respectivamente, 1 µl de uma solução concentrada de DNA plasmídico purificado anteriormente (*pBluescript KS II*, Stratagene, EUA) e 5 µl de água esterilizada. Todas as misturas foram colocadas em gelo, durante 60 min. Sucedeu-se a etapa do choque térmico, sendo as células transferidas para um banho-maria a 42 °C, durante 90 s, e colocadas, novamente, em gelo, durante 5 min. Posteriormente, adicionou-se 900 µl de meio LB líquido pré-aquecido, incubando-se os microtubos em agitação contínua a 80 rpm, durante 1 h, a 37 °C. Depois de finalizada a incubação, procedeu-se a uma centrifugação durante 10 min, a 6000 rpm (*Centrifuge 5415-D*, Eppendorf, Alemanha). Por fim, foram cuidadosamente removidos 800 µl de sobrenadante, sendo o sedimento celular ressuspendido no volume restante do mesmo meio (~200 µl). Em condições de assepsia, foi realizada a inoculação de duas placas de Petri com meio LB sólido (15 ml/placa), suplementado com X-gal, IPTG e ampicilina (Anexo 2), através da técnica de espalhamento com pérolas esterilizadas, as quais foram incubadas, durante a noite, a 37 °C.

3.8.2.3. Selecção de Clones Bacterianos

Tal como mencionado anteriormente (em 3.8.1), o pretendido é o crescimento de colónias de cor branca nas placas inoculadas, pois isto é indicativo de clones bacterianos transformantes (selecção com ampicilina) recombinantes prováveis

(selecção branco/azul). Assim, após o período de incubação, em condições de assepsia, realizou-se a repicagem de colónias brancas com palito estéril, procedendo-se à sua inoculação em 3 ml de meio LB líquido com ampicilina (100 µg/ml), em tubos descartáveis de 15 ml, incubando-se em agitação contínua a 220 rpm, a 37 °C, durante a noite.

3.8.2.4. Extração do DNA Plasmídico

Para a etapa de extração do DNA plasmídico, foi utilizado o método da lise alcalina (Birnboim e Doly, 1979), com adaptações. Retirou-se 2 ml da suspensão bacteriana, em crescimento durante a noite anterior, para um microtubo e realizou-se uma centrifugação a 13000 rpm, 1 min (*Centrifuge 5417C*, Eppendorf, Alemanha). Depois, o sobrenadante foi decantado e ressuspendeu-se o sedimento celular em 250 µl de tampão TEG (Anexo 2), frio, com o auxílio do vórtex. Em seguida, foi adicionado 250 µl de solução de lise (Anexo 2), tendo-se homogeneizado, cuidadosamente, por inversão, e colocando-se em gelo durante 5 min. Para que ocorra a neutralização do pH elevado dos lisados celulares, adicionou-se o mesmo volume de solução de acetato de potássio 3M, pH 4,8, misturando-se igualmente por inversão suave, sendo visível a formação de um precipitado branco. Para remoção deste precipitado, formado por restos celulares, seguiu-se um passo de centrifugação, a 13000 rpm, durante 15 min, a 4 °C (*Centrifuge 5415D*, Eppendorf, Alemanha), sendo recuperado o sobrenadante e colocado num novo microtubo. Adicionou-se 700 µl de isopropanol, para promover a precipitação do DNA plasmídico, e misturou-se por inversão, com uma consequente centrifugação, na mesma centrífuga, durante 25 min, a 13000 rpm, à temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado, adicionou-se 250 µl de etanol a 70% (v/v) ao sedimento obtido e procedeu-se a uma centrifugação durante 5 min, a 13000 rpm (*Centrifuge 5415D*, Eppendorf, Alemanha). Decantou-se o sobrenadante e secou-se, sob vácuo, o sedimento de DNA plasmídico, durante 5 min, com recurso a um evaporador (*Concentrator 5301*, Eppendorf, Alemanha). Para finalizar, o sedimento foi ressuspendido em 50 µl de TE (Anexo 2), suplementado com 50 µg/ml de RNase A, incubando-se durante 30 min, em banho-maria a 37 °C.

3.8.2.5. Selecção de Moléculas de DNA Plasmídico para Confirmação da Clonagem

Para confirmação do sucesso da clonagem, após a extracção do DNA plasmídico, efectuou-se uma electroforese em gel de agarose, a 1% (p/v), em tampão TAE 0,5X (Anexo 2), corado com brometo de etídeo (0,5 µg/ml), com a aplicação de 2 µl de cada amostra no gel. Realizou-se a comparação entre os padrões de migração dos diferentes DNAs plasmídicos obtidos, de modo a seleccionar os que tinham uma migração mais lenta no gel, indicativo de serem moléculas recombinantes. Estas foram então escolhidas para posterior hidrólise com a enzima de restrição EcoRI, que proporciona a excisão do fragmento de DNA clonado no vector plasmídico utilizado (ver Fig. 14).

3.8.2.6. Hidrólise do DNA Plasmídico com EcoRI

A enzima EcoRI, como representado na Fig. 14, reconhece dois locais que flanqueiam a região de clonagem múltipla no vector *pGEM[®]-T Easy* (Promega, EUA), permitindo a hidrólise dos plasmídeos recombinantes, com excisão do fragmento clonado. Para a digestão dos plasmídeos seleccionados, i.e., apresentado padrões de migração retardada, efectuou-se uma mistura constituída por 1-5 µl de solução de DNA extraído, 1 µl de *Fast Digest[®] EcoRI* (Fermentas, Canadá) (10 U/µl), 1,5 µl de tampão EcoRI 10X (Anexo 2) e um volume de água esterilizada ultrapura para perfazer um volume final de 15 µl. Esta mistura foi incubada a 37 °C durante 30 min. Posteriormente, fez-se a análise dos produtos de digestão após separação por electroforese em gel de agarose a 1,2% (p/v), em tampão TAE 0,5X (Anexo 2), com brometo de etídeo (0,5 µg/ml).

3.9. Extracção e Purificação de DNA Plasmídico para Sequenciação Nucleotídica

Depois de seleccionados os clones bacterianos transformantes, potencialmente recombinantes, por obtenção de um padrão de restrição do DNA plasmídico contendo fragmentos com os tamanhos aproximados esperados, procedeu-se à inoculação de 3,5 ml de meio LB líquido com ampicilina (100 µg/ml), a partir das culturas obtidas anteriormente por repicagem, e posterior incubação a 37 °C, durante a noite, com

agitação (220 rpm). No dia seguinte, a extracção e purificação do DNA plasmídico para sequenciação nucleotídica foi realizada com recurso ao *kit DNA Clean & Concentrator*TM-5 (Zymo Research, EUA), de acordo com as especificações do fabricante.

3.10. Sequenciação Nucleotídica

Uma vez purificadas, as amostras de DNA plasmídico foram enviadas para sequenciação nucleotídica na empresa STAB VIDA (Caparica, Portugal), com uma quantidade mínima de 1 µg de DNA/reacção de sequenciação. Como *primer* de sequenciação foi utilizado o *primer* universal T7 (sentido directo), complementar a uma das sequências que flanqueiam o sítio de clonagem múltipla do vector *pGEM*[®]-*T Easy* (Promega, EUA) (ver Fig. 14). A sequenciação foi realizada pelo método de terminação de cadeia (Sanger et al., 1977).

3.11. Análise Bioinformática das Sequências Nucleotídicas

Os cromatogramas relativos às reacções de sequenciação foram analisados a fim de se localizar a sequência nucleotídica correspondente ao fragmento de DNA clonado no vector plasmídico, tendo-se recorrido, para esse fim, ao programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*, v.7.0.9.0. (em <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>).

Com o objectivo de se confirmar, de um modo rápido, a identidade das sequências nucleotídicas obtidas realizou-se uma pesquisa de regiões de semelhança local entre sequências, utilizando-se o programa BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Este programa indica a percentagem de semelhança entre duas sequências e fornece uma estimativa da probabilidade dessa semelhança ser devida ao acaso (*E value*, 0-1).

4. Resultados

4.1. Caracterização da População Estudada

Este trabalho encontra-se inserido no projecto europeu SIALON II (ver em <http://www.sialon.eu/en/>), o qual foi aprovado para financiamento ao abrigo do Programa de Saúde Pública da Comissão Europeia 2008-2013, tendo tido o seu início no ano de 2011. Este projecto colaborativo visa realizar e promover a prevenção das infecções sexualmente transmissíveis (IST) entre HSH, nomeadamente a transmissão do HIV. Além disso, o projecto visa igualmente criar uma rede de instituições europeias capacitadas para a implementação de novas ferramentas para a vigilância de IST, em apoio de estratégias integradas e abrangentes de prevenção da transmissão do HIV. Graças a uma colaboração com a UNAIDS e a OMS, o projecto SIALON II tem uma cobertura geográfica alargada, sendo implementado através de 14 parceiros associados e 17 instituições colaborantes, tanto na UE (Alemanha, Bélgica, Bulgária, Eslováquia, Eslovénia, Espanha, Itália, Lituânia, Polónia, Portugal, Reino Unido, Roménia e Suécia), como em países vizinhos (Arménia e Moldávia). A sua coordenação e implementação local encontram-se a cargo do Instituto de Higiene e Medicina Tropical (Prof. Doutora Sónia Dias) e do GAT (Grupo Português de Activistas sobre Tratamentos de VIH/SIDA Pedro Santos), enquanto a coordenação geral é da responsabilidade do Hospital Universitário de Verona, em Itália (Dr. Massimo Mirandola).

O grupo populacional em estudo em Portugal foi constituído por 409 indivíduos, do sexo masculino, da Área Metropolitana de Lisboa (distritos de Lisboa e Setúbal), com idades compreendidas entre 19 e 76 anos, maioritariamente com nacionalidade portuguesa (60,4%, n=247), que tinham em comum o facto de reportarem práticas sexuais com outros homens, pelo menos uma vez durante os últimos 12 meses, sendo portanto aqui genericamente designados por HSH (Fig. 15). Relativamente ao nível académico/grau de literacia da amostra, identificou-se uma maior percentagem de indivíduos com o ensino superior, 62,3% (n=255), e, em seguida, com o ensino secundário, representado por 18,1% (n=74) dos participantes (Fig. 15). Tendo em

4. Resultados

consideração o objectivo geral de detectar a infecção por HIV em HSH, para efeitos de vigilância epidemiológica, com base na pesquisa de anticorpos anti-HIV através da utilização de fluido oral, foram colhidas amostras de fluido oral a cada indivíduo que aceitou participar, em locais de reunião habitual de HSH: duas discotecas, um café, quatro bares, duas saunas, um local de *cruising* (“engate”) e um evento especial, o *Arraial Pride 2013 – Lisbon Gay Pride Festival*.

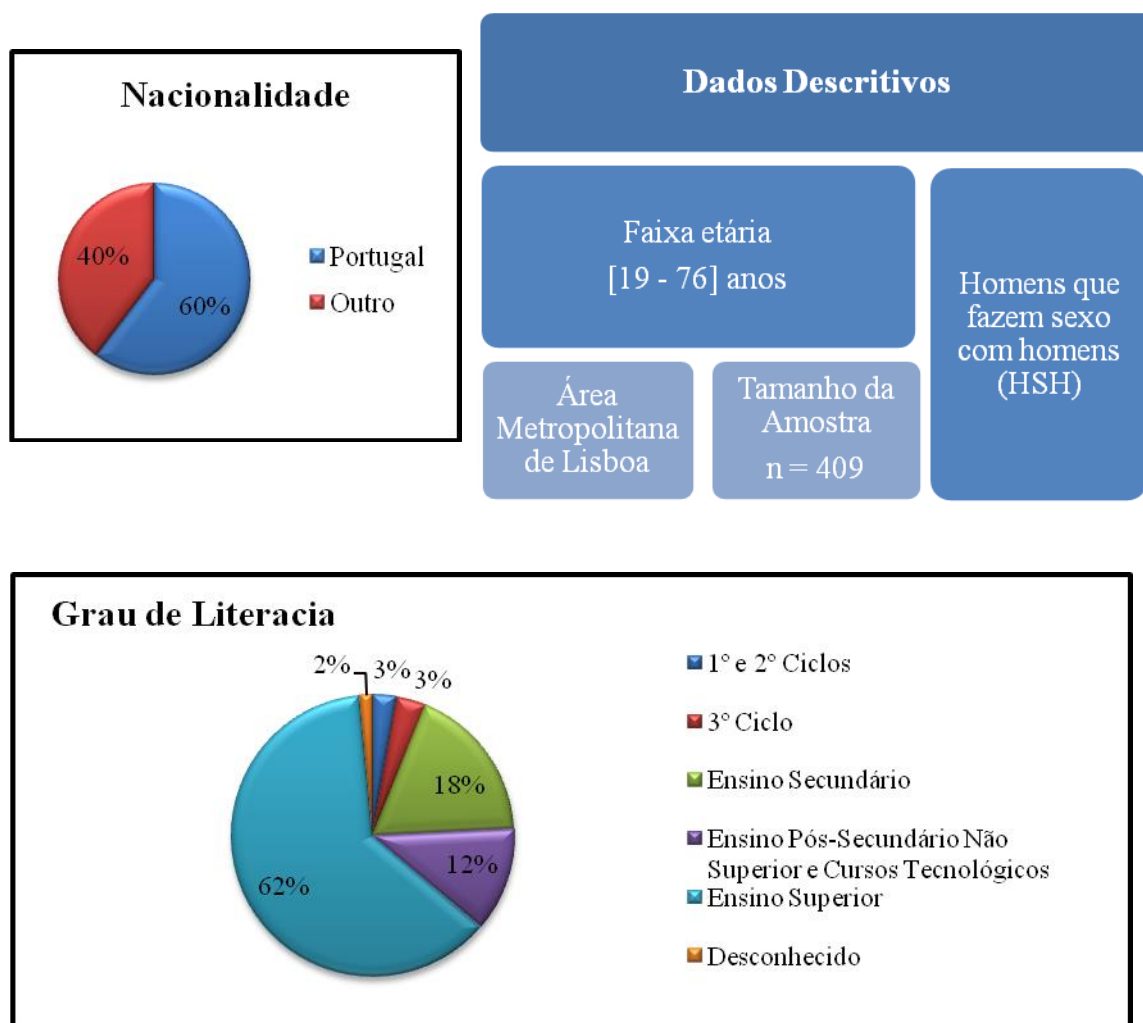


Fig. 15 - Representação gráfica, em percentagem, e esquemática dos dados descritivos da amostra populacional incluída no estudo: tamanho da amostra e região alvo do estudo, nacionalidade, faixa etária e grau de literacia dos indivíduos participantes.

No que respeita aos comportamentos e atitudes dos indivíduos face à infecção pelo HIV, embora não tenha sido fornecida informação extensa e específica relativa aos mesmos, foi possível verificar (Fig. 16) que, aproximadamente, metade dos participantes afirma ter realizado o teste para detecção de infecção por HIV no último ano e possuir conhecimento dos resultados correspondentes, tal como cerca de 45% revela ter recebido, alguma vez, informação relativa à prevenção da infecção pelo HIV. Quanto à proporção que declara ser seropositivo para o HIV e ter contraído recentemente uma IST, corresponde a 8% do total de indivíduos participantes. (SIALON II Project, 2013)

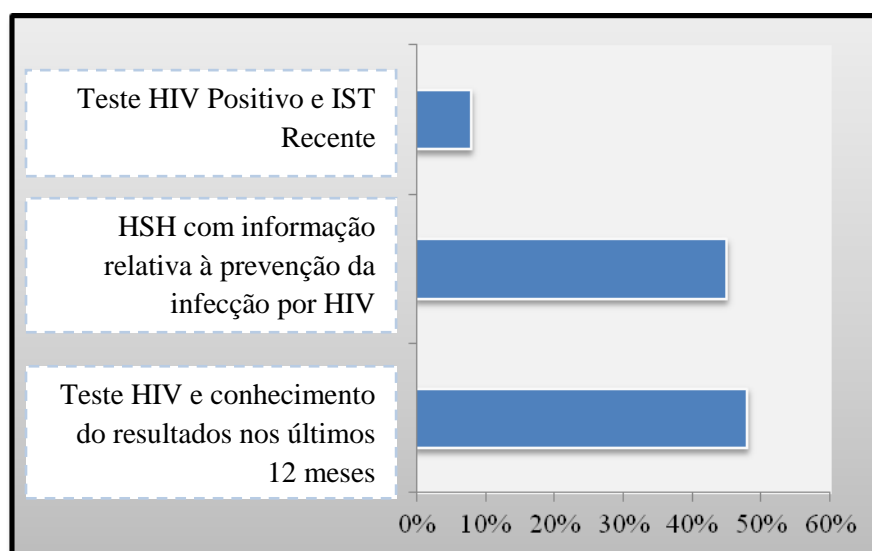


Fig. 16 - Representação gráfica dos conhecimentos e atitudes (ítems seleccionados) dos indivíduos em estudo em Portugal face à infecção pelo HIV (disponível em: <http://www.sialon.eu/en/>).

4.2. Detecção de Anticorpos Anti-HIV no Fluido Oral

Para a detecção de anticorpos anti-HIV no fluido oral, aplicou-se um algoritmo baseado na utilização sequencial de dois tipos de teste ELISA, um de terceira geração (*GenscreenTM HIV-1/2 Version 2*, Bio-Rad, França), aqui utilizado como teste de rastreio, e um de quarta geração (*Vironostika[®] HIV Ag/Ab*, bioMérieux, França), utilizado como teste confirmatório, segundo as especificações descritas anteriormente (no capítulo Material e Métodos – Fig. 12). Todas as amostras de fluido oral (n=409),

4. Resultados

após processamento, foram testadas para a presença de anticorpos anti-HIV com recurso ao primeiro teste, tendo-se obtido um número de amostras positivas de 121 (29,6%) e de amostras negativas de 288 (70,4%), o que corresponde a uma taxa de detecção muito elevada (Fig. 17). Sempre que os valores de absorvância obtidos se encontravam na chamada “zona cinzenta”, i.e., compreendidos entre 90% do valor de limiar de positividade do teste (ou *cut-off*) e o próprio, a amostra em causa era submetida a retestagem. Cada um dos testes ELISA efectuados foi submetido a validação, de acordo com as especificações do fabricante, passo particularmente importante, especialmente se considerada a realização não-automatizada dos testes ELISA durante este trabalho.

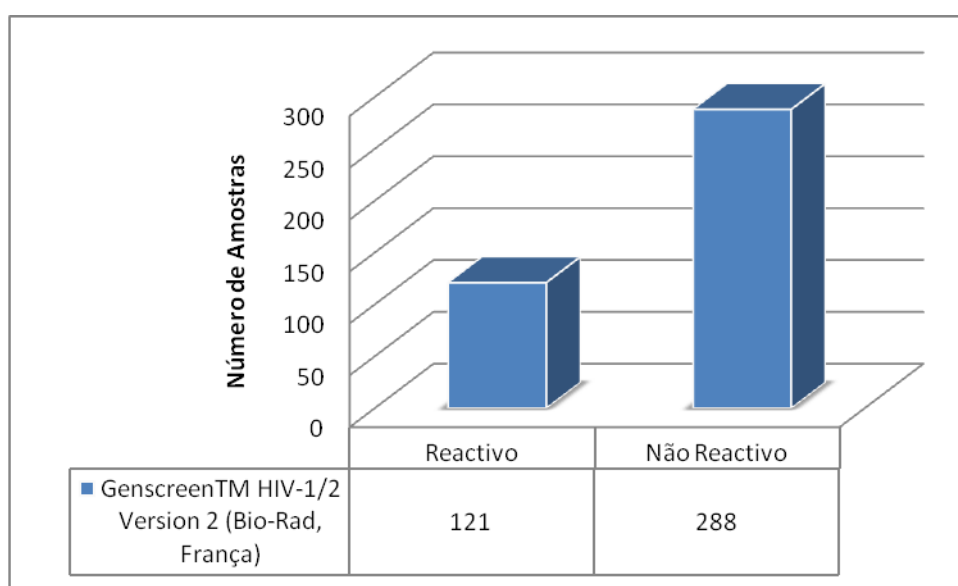


Fig. 17 - Gráfico representativo da detecção de anticorpos anti-HIV no fluido oral, pelo ensaio imunoenzimático de *Genscreen*TM HIV-1/2 Version 2, Bio-Rad, França.

Seguindo o algoritmo de teste adoptado, as amostras inicialmente reactivas foram retestadas, com recurso ao segundo teste previamente mencionado (*Vironostika*[®] HIV Ag/Ab, bioMérieux, França). Das 121 amostras de fluido oral testadas, 69 (57,0%) revelaram-se positivas, confirmando o resultado obtido anteriormente, e 52 (43,0%) foram consideradas negativas para a presença de anticorpos anti-HIV (Fig. 18). Os critérios de validação deste novo lote de testes foram igualmente seguidos de acordo com as instruções do fabricante. Considerando o número algo elevado de amostras (n=52) com resultados discrepantes entre os dois testes, procurou-se repetir o segundo teste para o maior número possível de amostras. No entanto, por questões de ordem

prática, apenas foi possível retestar 21 daquelas amostras (21/52, 40,4%), sendo possível confirmar para todas estas o resultado negativo obtido com o *kit Vironostika® HIV Ag/Ab* (bioMérieux, França).

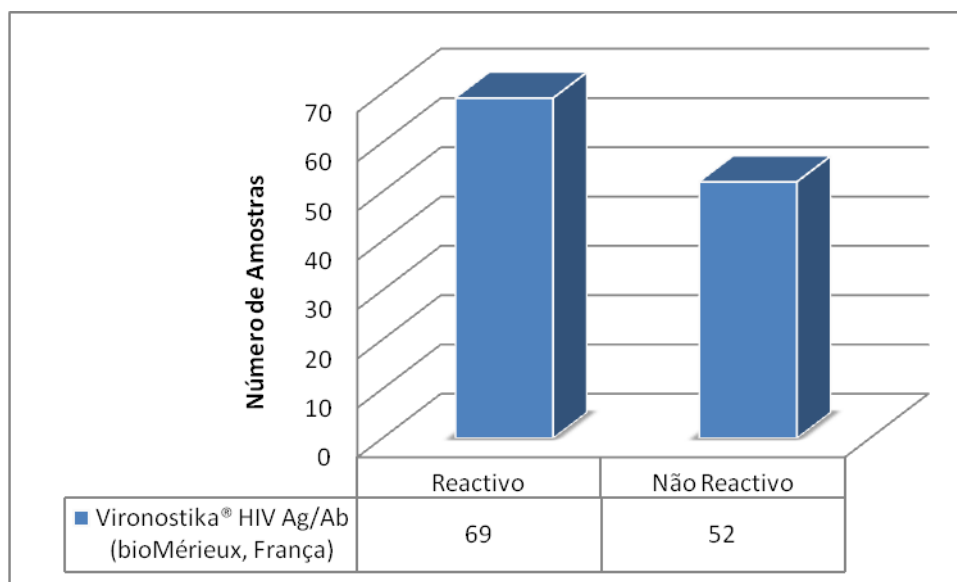


Fig. 18 - Gráfico representativo da detecção de anticorpos anti-HIV no fluido oral, pelo ensaio imunoenzimático *Vironostika® HIV Ag/Ab*, bioMérieux, França.

Em conclusão, a aplicação do algoritmo adoptado para a detecção de anticorpos anti-HIV no fluido oral dos HSH incluídos no estudo permitiu a identificação de um grupo de 69 amostras positivas para a presença destes anticorpos, num total de 409 amostras testadas. Ainda de acordo com o algoritmo de teste, as amostras com resultados discrepantes entre os dois ensaios imunoenzimáticos utilizados (n=52), bem como as amostras inicialmente negativas (n=288), perfazendo um total de 340 amostras, foram sujeitas a um doseamento de imunoglobulinas G (IgG) totais, a fim de certificar a sua qualidade (ver subcapítulo seguinte). Os resultados discriminados dos testes efectuados a cada amostra de fluido oral são apresentados no Anexo 6.

4.3. Doseamento de IgGs no Fluido Oral

Segundo o algoritmo de teste adoptado (Fig. 12), sempre que as amostras de fluido oral testadas para a presença de anticorpos anti-HIV se revelavam negativas, ou com resultados discrepantes, seria obrigatório confirmar-se a sua qualidade, nomeadamente, pela quantificação de IgG totais, dada a provável heterogeneidade de volumes e qualidade das amostras

obtidas. Assim, o terceiro imunoensaio inserido no algoritmo aplicado, utilizado para a validação dos resultados obtidos, remete para a utilização de mais um método imunoenzimático (resultados exemplificados na Fig. 19), com o objectivo de se dosear a quantidade de IgGs presentes no fluido oral de amostras seleccionadas, por interpolação a partir de uma curva padrão específica para cada teste,

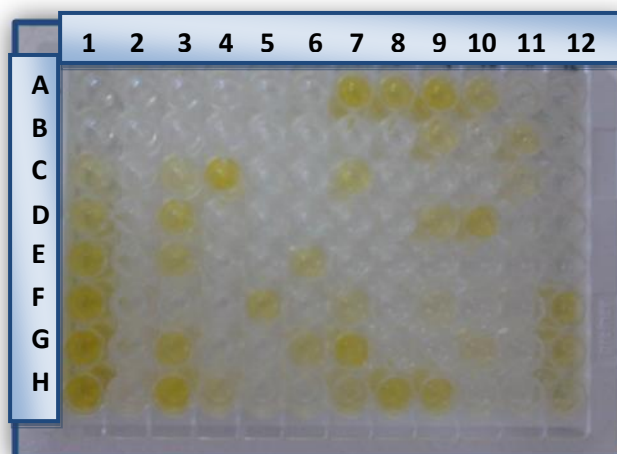


Fig. 19 – Exemplo de resultado obtido nos ensaios de doseamento de IgGs no fluido oral, por ELISA, utilizando o kit comercial *Human IgG* (Immunology Consultants Laboratory, Inc., EUA). Coluna 1: A e B - Brancos; C a H – Soluções-padrão de concentração conhecida de IgG (calibradores). Exemplo de resultados positivos (poço A7) e negativos (poço A2).

construída com recurso a soluções de IgG de concentração conhecida, compreendida entre 0 e 500 ng/ml (ver subcapítulo 3.4, em Material e Métodos, e Anexo 7, para exemplo de curvas padrão construídas com recurso a um modelo de regressão logístico de quatro parâmetros). Pelo facto da metodologia utilizada para a recolha de amostras de fluido oral só muito dificilmente assegurar uma grande constância de volumes colhidos, bem como considerada a própria natureza da amostra colhida e a existência de diferenças de natureza individual, foi estabelecido um nível mínimo de IgG para inclusão das amostras neste estudo ($\text{IgG} \geq 3,5 \text{ mg/L}$), considerando-se as amostras com concentração inferior de qualidade não aceitável e a excluir.

Relativamente aos resultados obtidos (Fig. 20), 37 amostras foram excluídas do estudo por apresentarem concentrações muito baixas de IgG, inferiores ao valor limite previamente estabelecido para este projecto, correspondentes a 9,0% do total de amostras colhidas. Identificou-se, concomitantemente, que 91,0% das amostras ($n=372$),

continham uma concentração superior a 3,5 mg/L de IgGs, ou seja, têm os requisitos para integrar o estudo (assumindo-se que nas 69 amostras positivas para a presença de anticorpos anti-HIV, e não testadas, a concentração de IgG não seria um factor limitante). No total das 340 amostras testadas, os valores de concentração de IgG apresentaram-se muito heterogéneos, variando entre um mínimo de 0 e um valor de concentração máximo de 78,3 mg/L. Todas as amostras excluídas do estudo foram testadas pelo menos duas vezes.

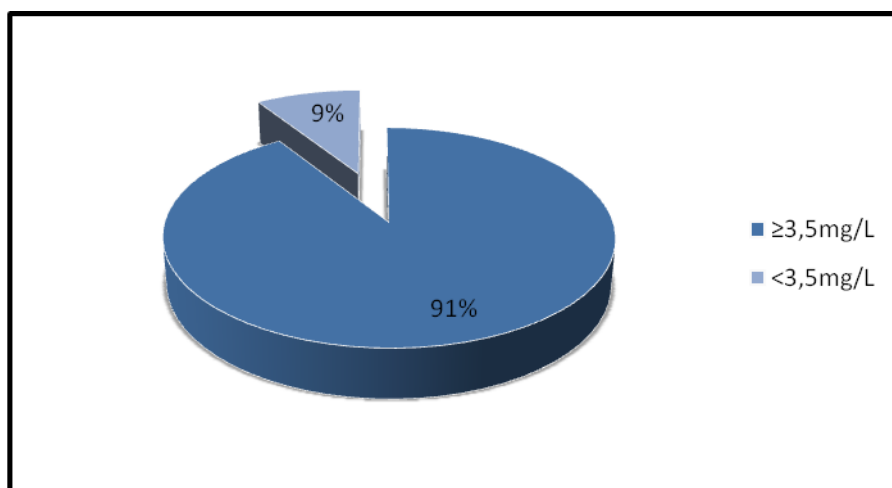


Fig. 20 - Gráfico correspondente à taxa global de inclusão/exclusão de amostras neste estudo, baseada nos doseamentos de IgGs nas amostras de fluido oral.

Em conclusão, o número final de amostras validado para inclusão neste estudo é 372, obtendo-se assim uma taxa de detecção de anticorpos anti-HIV no fluido oral de HSH da região da Grande Lisboa de 18,5% (69/372).

4.4. Amplificação por *nested*-PCR

Como referido no capítulo anterior (Material e Métodos), neste trabalho, a amplificação de uma região codificante da transcriptase reversa do gene *pol* de HIV-1, de 650 pb, foi efectuada por *nested*-PCR, a partir de amostras de DNA total extraído e purificado dos sedimentos celulares obtidos das amostras de fluido oral dos 69 indivíduos nos quais fora detectada a presença de anticorpos anti-HIV. Foi utilizado o protocolo descrito por Steegen et al. (2006), com adaptações (Videira e Castro, 2010), e,

dada a elevada inespecificidade inicial de resultados, o protocolo-base foi alvo de experiências de optimização, conforme mencionado no subcapítulo 3.6. Recorreu-se à utilização de seis *primers*, em duas reacções consecutivas, que, em conjunto, permitiriam um aumento da sensibilidade da reacção de amplificação. Este foi um factor importante levado em consideração, dada a proveniência e a natureza das amostras de DNA matriz utilizadas para a amplificação.

Como produto resultante das reacções de *nested*-PCR efectuadas, apenas se obteve um produto específico em 3 das 69 amostras testadas (4,3% de sucesso de amplificação), nomeadamente, nas amostras 13, 44 e 82, sendo, nesses casos, possível visualizar, após separação por electroforese em gel de agarose, bandas com tamanho aproximado esperado, embora de muito fraca intensidade. Um resultado característico está representado na Fig. 21. Tal como se pode verificar na figura, os amplicões obtidos não apresentavam quantidades significativas de DNA, pelo que não seria viável o envio imediato dos mesmos para sequenciação nucleotídica directa. Procedeu-se então à sua extracção e purificação a partir do gel de agarose e, consequente clonagem no vector plasmídico *pGEM[®]-T Easy* (Promega, EUA), segundo o protocolo experimental anteriormente descrito.

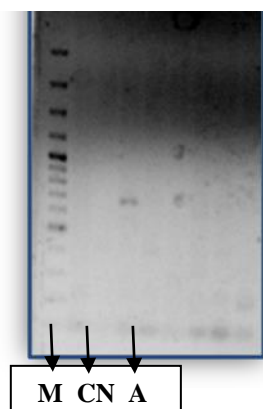


Fig. 21 - Fotografia de gel de agarose a 1,5% (p/v), em tampão TAE 0,5X, com brometo de etídeo (0,5 µg/ml), após separação electroforética, onde se observa o resultado de uma das experiências de amplificação por *nested*-PCR (amostra nº 13).

M – Marcador de massa molecular *Gene RulerTM 100 bp Plus DNA Ladder* (Fermentas, Canadá); CN - Controlo negativo (ou de contaminação); A – Amostra nº13.

4.5. Clonagem no Vector Plasmídico *pGEM[®]-T Easy*

Para os três produtos de amplificação obtidos, foi necessário realizar-se o processo de clonagem para obtenção de uma maior quantidade de DNA para sequenciação nucleotídica. Para isso, procedeu-se à extracção directa dos fragmentos resultantes a partir do gel de agarose, e posterior purificação, para clonagem com recurso ao sistema comercial *pGEM[®]-T Easy* (Promega, EUA), tendo como hospedeiro a bactéria *E. coli* JM109.

Após transformação de células competentes de *E. coli* JM109 com as misturas de ligação, previamente preparadas (ver subcapítulo 3.8.2.2, em Material e Métodos) e contendo cada um dos fragmentos de DNA extraídos e purificados, procedeu-se à selecção de clones bacterianos transformantes e recombinantes putativos (colónias de cor branca) (Fig. 22), após incubação em meio LB agar, na presença de ampicilina, X-gal e IPTG (Anexo 2), com base no sistema de α -complementação descrito no capítulo anterior (ver subcapítulo 3.8.2.3, em Material e Métodos).

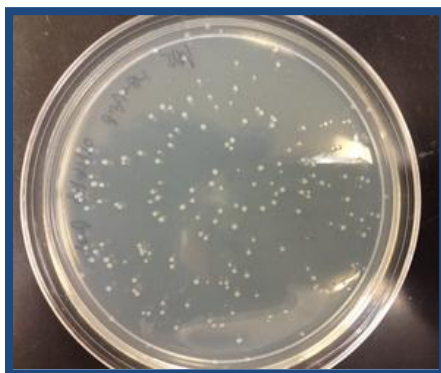


Fig. 22 - Rastreio de clones bacterianos recombinantes baseado no sistema de α -complementação branco/azul, em meio LB agar com ampicilina, X-gal e IPTG. O aparecimento de colónias brancas sugere a inserção do fragmento de DNA amplificado no local de clonagem múltipla no gene *lacZ'* do vector plasmídico *pGEM[®]-T Easy* (Promega, EUA) (disponível em: <https://vdsstream.wikispaces.com/GRACE+T>).

De modo a controlar os procedimentos de transformação, realizaram-se dois controlos, um positivo e outro negativo, tal como descrito no subcapítulo 3.8.2.2. As placas correspondentes ao controlo positivo (bactérias transformadas com uma solução concentrada de *pBluescript KS II*, Stratagene, EUA) apresentaram crescimento de

colónias de cor azul, comprovando a competência das células bacterianas utilizadas na transformação, enquanto nas placas correspondentes ao controlo negativo (bactérias sem adição de qualquer DNA plasmídico) não houve crescimento bacteriano, validando o hospedeiro (JM109), pelo facto desta estirpe de *E. coli* ser naturalmente susceptível à ampicilina, e as condições de assepsia que estavam a ser utilizados na experiência.

Finalmente, procedeu-se à repicagem, preferencialmente, de colónias de cor branca (Fig. 22), em condições de assepsia, e inoculou-se meio LB fresco com ampicilina, incubado durante a noite, para crescimento bacteriano. As culturas assim obtidas foram submetidas ao método de lise alcalina com o objectivo de extrair os DNAs plasmídicos (ver subcapítulo 3.8.3, em Materiais e Métodos).

4.5.1. Selecção de Plasmídeos Recombinantes

Para cada conjunto de repicagens efectuadas, correspondentes às três experiências de clonagem dos amplicões provenientes das três amostras com resultado de amplificação positivo (Fig. 21), foram seleccionados várias plasmídeos apresentando padrões de migração comparativos retardados, em campo eléctrico (electroforese em gel de agarose) (assinalados na Fig. 23).

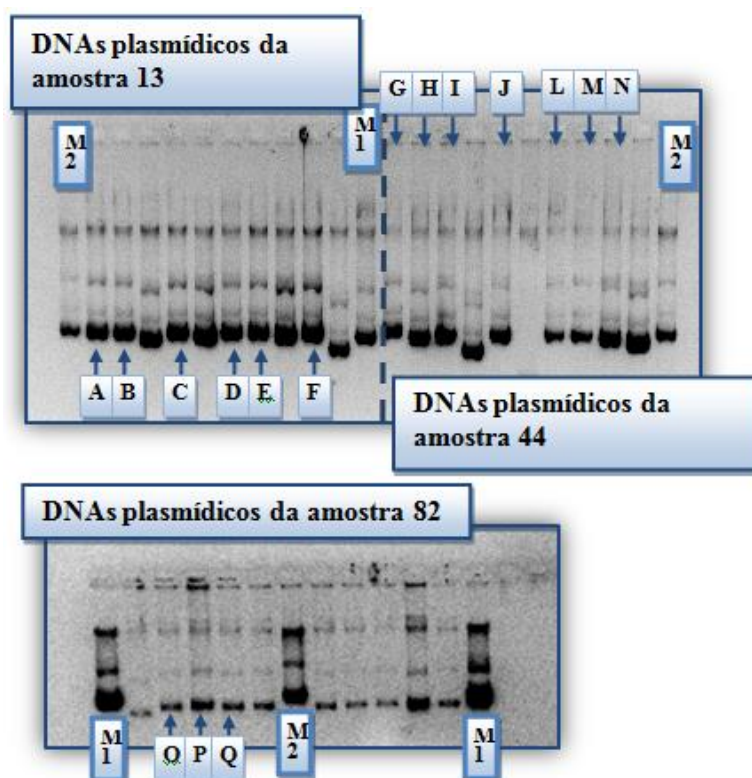


Fig. 23 - Representação dos DNAs plasmídicos extraídos de clones bacterianos transformantes e recombinantes putativos relativos às amostras 13, 44 e 82, após electroforese em gel de agarose a 1,2%(p/v), em tampão TAE 0,5X, com brometo de etídeo (0,5 µg/ml). Foi atribuída uma letra, de A a Q, correspondente a cada DNA plasmídico seleccionado para hidrólise com EcoRI (assinalados com setas de cor azul). M1 – “Marcador interno” de 500 pb; M2 – “Marcador interno” de 725 pb.

A fim de se confirmar a ligação correcta do fragmento pretendido, planeou-se uma experiência de hidrólise dos DNAs plasmídicos seleccionados com a enzima de restrição EcoRI (uma vez que esta enzima reconhece locais que flanqueiam o sítio de clonagem). Procedeu-se então à identificação presuntiva de seis clones recombinantes (A a F) relativamente à amostra 13 e de sete clones (G a N) para a amostra 44 (Fig. 23). Quanto à amostra 82, e por comparação com os “marcadores internos” utilizados (plasmídeos análogos contendo “*inserts*” de tamanho conhecido), nenhum dos plasmídeos extraídos aparentava conter um fragmento clonado de tamanho maior de 500 pb. Ainda assim, seleccionaram-se três clones (O a Q) para hidrólise enzimática.

Após hidrólise com a enzima de restrição EcoRI, foi possível observar-se os diversos padrões de restrição apresentados na Fig. 24.

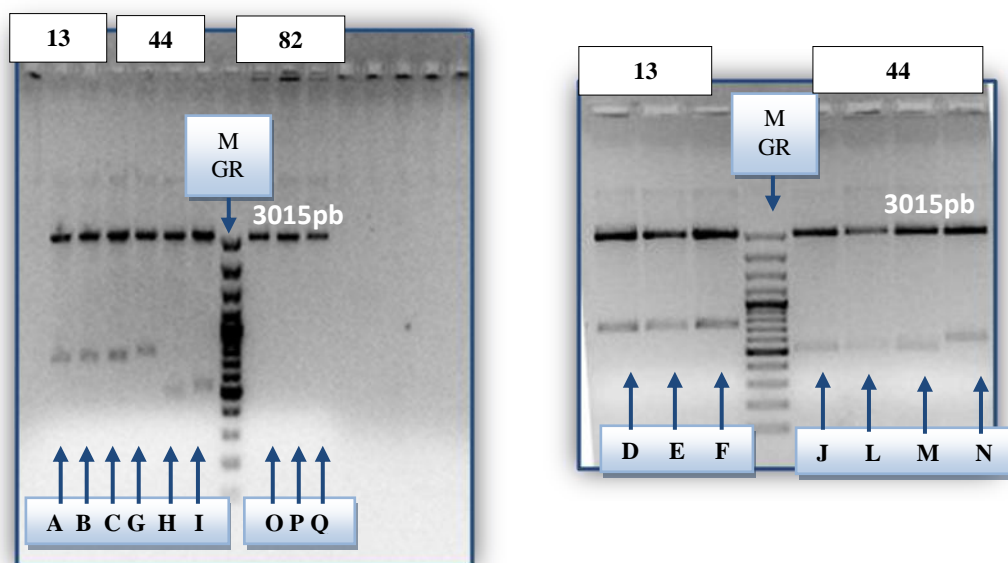


Fig. 24 - Representação dos perfis de digestão com EcoRI dos DNAs plasmídicos extraídos de clones bacterianos transformantes e recombinantes putativos relativos às amostras 13, 44 e 82, após electroforese em gel de agarose a 1,2% (p/v), em tampão TAE 0,5X, com brometo de etídeo (0,5 µg/ml). Letras A a Q correspondentes às mesmas amostras da Fig. 23. MGR - Marcador de massa molecular *Gene Ruler™ 100 bp Plus DNA Ladder* (Fermentas, Canadá).

Os padrões de restrição obtidos tanto nos fragmentos de DNA clonados da amostra 13 (A a F), como da amostra 44 (G a N) (Fig. 24), têm duas bandas, uma de cerca de 3000 pb, referente ao vector plasmídico na sua forma linearizada, que será

3015 pb, e outra relativa ao fragmento efectivamente clonado. No entanto, contrariamente ao esperado, nenhum dos padrões observados indicava a clonagem de um fragmento de 650 pb, resultante da amplificação por PCR de uma região codificante da transcriptase reversa do gene *pol* de HIV-1. Ainda assim, resolveu-se proceder à selecção de alguns clones representativos do tipo de resultados obtidos para posterior sequenciação nucleotídica, para efeitos de confirmação. Relativamente à amostra 13, cujos fragmentos clonados revelam maior homogeneidade em termos de tamanho, foram seleccionados os clones D e F (Fig. 24), embora, à partida, fosse desde logo possível constatar que tinham tamanhos superiores a 650 pb. Os amplicões da amostra 44 revelaram tamanhos mais heterogéneos, tendo-se seleccionado os clones G, H, J e N para sequenciação, sendo este último o que oferecia maior probabilidade de corresponder ao fragmento pretendido. Quanto à amostra 82 (O a Q) (Fig. 24), observou-se apenas o fragmento específico do plasmídeo linearizado, pelo que se confirmou a inexistência, neste caso, dos clones transformantes recombinantes pretendidos.

4.6. Análise Bioinformática de Sequências Nucleotídicas

Os cromatogramas obtidos para cada uma das seis reacções de sequenciação nucleotídica foram cuidadosamente analisados, com recurso ao programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*, v.7.0.9.0. (disponível em <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>), a fim de se localizar a sequência correspondente ao fragmento clonado no vector plasmídico utilizado. Após edição, cada uma das sequências obtidas (ver Anexo 8) foi utilizada para pesquisa rápida de regiões de semelhança local entre sequências, recorrendo ao programa informático *BLAST* (do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*) (disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Ao submeter cada uma das sequências editadas, o programa elabora um relatório com indicação das sequências depositadas na base de dados *GenBank* (em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) com maior semelhança com aquela que está em estudo, encontrando-se associados diversos factores de medição, tal como o componente estatístico *E value*. Este último, variando entre zero e um, permite estimar a probabilidade de existir uma semelhança ao acaso, sendo que o resultado mais próximo de zero representa uma fiabilidade praticamente total.

4. Resultados

Corroborando o facto observado anteriormente dos amplicões obtidos por PCR não corresponderem exactamente aos tamanhos teóricos esperados para a região em estudo (650 pb), os resultados da pesquisa rápida de regiões de semelhança local entre as sequências nucleotídicas obtidas neste trabalho e as depositadas no *GenBank*, para ambas as amostras de fluido oral (13 e 44), não vieram a confirmar a presença de DNA proviral do HIV-1 (Quadro 5). As sequências obtidas, mostrando, na sua globalidade, uma identidade, mais ou menos evidente, com sequências genómicas de bactérias muito comuns na cavidade oral e/ou tracto orofaríngeo humano e de outros animais (géneros *Streptococcus*, *Leptotrichia* e *Capnocytophaga*), algumas das quais constituindo patógenos oportunistas, vieram comprovar a ocorrência de amplificação não específica, nas duas amostras em causa, a partir de uma matriz muito rica em DNA de origem bacteriana. Em conclusão, e com base na metodologia utilizada, não houve, portanto, quaisquer amostras de fluido oral positivas para a presença de DNA proviral do HIV-1.

Amostra	Clone	Espécie mais provável	Cobertura (%)	<i>E value</i>	Identidade (%)
13	D e F	<i>Streptococcus oligofermentans</i> AS 1.3089	100	0.00	92
44	G**	<i>Capnocytophaga ochracea</i> DSM 7271	42	6×10^{-34}	73
	H	<i>Leptotrichia buccalis</i> DSM 1135	100	1×10^{-81}	85
	J**	<i>Streptococcus pyogenes</i> (várias estirpes)	91	7×10^{-76}	73
	N	<i>Streptococcus oralis</i> Uo5	100	0.00	93

**NOTA: semelhança encontrada apenas com recurso à opção do programa *BLAST* “more dissimilar sequences (discontiguous megablast)”.

Quadro 5 - Resultados da pesquisa rápida, com recurso ao programa *BLAST*, de regiões de semelhança local entre as sequências nucleotídicas obtidas neste trabalho e sequências depositadas no *GenBank*.

5. Discussão e Conclusões

No que respeita às vias de transmissão do HIV, a via sexual continua a ser a mais relevante, representando aproximadamente 85% dos casos de infecção a nível mundial (Takebe et al., 2008). As taxas e vias de transmissão da infecção mantêm-se muito heterogéneas, do ponto de vista geográfico, havendo uma correlação entre a prevalência da infecção e comportamentos sociais, tais como as práticas sexuais e o uso de drogas por via intravenosa (Bitrus e Okechukwu, 2015). A contribuição da prática sexual entre homens, como via de transmissão do HIV, é igualmente bastante heterogénea do ponto de vista geográfico. Se na África subsariana os modos de transmissão mais frequentes são a via vertical, da mãe infectada para o seu filho, e as relações heterossexuais, o mesmo já não acontece na Europa Ocidental e Central e América do Norte, regiões nas quais a maioria das novas infecções ocorre actualmente nos homens que fazem sexo com homens (HSH) (Bitrus e Okechukwu, 2015). Na América do Norte, por exemplo, estima-se que, em 2013, cerca de 48% das novas infecções estivessem associadas a este grupo. Relativamente à Europa, a transmissão entre HSH corresponde a 40 e 27% dos novos casos de infecção, respectivamente, na Europa Ocidental e Central (Bozicevic et al., 2013).

A nível global, os HSH têm 19 vezes maior probabilidade de estar infectados pelo HIV do que a população em geral (Beyrer et al., 2012). Segundo o *UNAIDS Global Report 2013* (UNAIDS, 2013), a prevalência mediana da infecção entre HSH em todas as regiões do mundo excede 1%, sendo consistentemente mais elevada do que a descrita, em geral, para os indivíduos do sexo masculino. As prevalências da infecção entre HSH, em 2013, variavam entre valores inferiores a 1%, em nove países, até valores acima de 50%, em alguns países africanos (Mauritânia e Guiné, com 54 e 57%, respectivamente) (*Global AIDS Response Progress Reporting*, GARPR, 2014). Em 2012, e ainda de acordo com o relatório GARPR, a maior prevalência mediana de infecção pelo HIV entre HSH foi relatada para a África Ocidental e Central (19%) e a África Oriental e Austral (15%). Com níveis mais baixos, mas ainda assim significativos, surgem os HSH da América Latina (12%), Ásia e Pacífico (11%), Europa Ocidental e Central e América do Norte (8%) e Caraíbas (7%). Esta informação é

consistente com os resultados de uma meta-análise de estudos epidemiológicos disponíveis, realizada em 2012, que constatou que a prevalência do HIV entre HSH nas Américas, sul e sudeste asiático e África subsariana variava entre 14 e 18% (Beyrer et al., 2012). Por outro lado, a incidência da infecção pelo HIV entre HSH parece estar a aumentar em várias partes do mundo (Beyrer et al., 2012), incluindo muitos países europeus, como Portugal, mas também na América do Norte e Austrália (Sullivan et al., 2009; Phillips et al., 2013). Na Europa Ocidental e Central, o número de diagnósticos de HIV entre HSH aumentou 33% entre 2004 e 2011. No mesmo período, acréscimos de mais de 100% foram observados em vários países europeus (Chipre, República Checa, Hungria, Irlanda, Letónia, Eslováquia e Eslovénia) (Beyrer et al., 2012), enquanto o Reino Unido tem experimentado um aumento constante desde 2007 (*UK Health Protection Agency*, 2012). Dezanove países da União Europeia reportaram prevalências de infecção superiores a 5% entre os HSH, em 2012 (ECDC/OMS, 2013). As prevalências de infecção pelo HIV são particularmente elevadas entre os trabalhadores do sexo do género masculino, atingindo valores próximos de 20% na Alemanha e de 15% em Portugal (GARPR, 2014).

Em Portugal, os dados mais recentes sobre a infecção, datando de 2013, indicam que embora o modo mais frequente de transmissão do HIV tenha sido o contacto heterossexual, referido em 61% dos 1093 novos casos reportados, os HSH totalizaram 30% dos casos de infecção e 43%, quando considerados apenas os indivíduos do género masculino. Os HSH tendem a ser mais jovens que os heterossexuais à data de diagnóstico, metade tendo idade inferior ou igual a 32 anos (Departamento de Doenças Infecciosas do INSA, DDIINSA, 2014). O aumento do número de novos diagnósticos de infecção por HIV em jovens HSH, bem como a elevada percentagem de diagnósticos tardios em heterossexuais de meia-idade, são tendências recentes da epidemia portuguesa. A análise de tendências relativa ao número de novos casos diagnosticados em Portugal em cada categoria de transmissão demonstra um lento decréscimo no número de casos para a categoria de transmissão heterossexual, uma forte redução nos casos associados à toxicodependência e uma tendência crescente no número de casos decorrentes de relações sexuais entre homens, revelando uma clara alteração na distribuição relativa dos casos nas principais categorias de transmissão (DDINSA,

2014). Estes dados tornam evidente a necessidade de reforço das medidas de prevenção dirigidas aos HSH, particularmente aos mais jovens.

Os dados disponíveis sobre a prevalência da infecção pelo HIV nos HSH em Portugal são, na sua maioria, fragmentados e baseados em estudos de pequena dimensão, por isso, muito provavelmente, não totalmente representativos. Segundo a UNAIDS, as prevalências estimadas variavam entre 1,3%, em 2005, e 10,2%, em 2011, com valores consistentemente mais elevados para a faixa etária acima dos 25 anos, na qual o valor de prevalência estimada atingiu 12,1%, em 2011 (em <http://aidsinfo.unaids.org>). Um pequeno estudo-piloto realizado em 2010, em Lisboa, reportou uma taxa de reactividade no teste rápido de 11,6% (Fuertes et al., 2011). Neste mesmo ano, decorreu, à escala europeia, o maior estudo internacional conduzido até então entre HSH: *The European MSM Internet Survey* (EMIS) (ver em <http://www.emis-project.eu/>). Este estudo, que incluiu cerca de 5000 participantes com origem em Portugal, disponibilizou um questionário anónimo *online*, em 38 países europeus e 25 línguas diferentes, com o intuito de recolher informação de natureza sócio-demográfica acerca dos HSH europeus, práticas e comportamentos sexuais, infecção pelo HIV e consumo de substâncias aditivas (Carvalho et al., 2013). Mesmo considerando um possível viés de selecção, este estudo representa até hoje a melhor fonte de informação acerca dos comportamentos e atitudes da população HSH em Portugal, cujo conhecimento continua ainda escasso. Entre os inúmeros dados obtidos, foi possível perceber a existência de uma prática corrente de comportamentos de risco nesta população, podendo destacar-se: 18% dos indivíduos que estavam numa relação estável reportaram um número de parceiros ocasionais igual ou superior a dez nos últimos doze meses (esta percentagem sobe para 23%, entre os que não tinham parceiro estável); o número médio de parceiros sexuais ocasionais, nos últimos doze meses, independentemente de terem ou não uma relação estável, era de 5,4 ($\pm 4,5$); 67% dos participantes reportou a prática de sexo anal sem preservativo nos últimos doze meses; 28% dos indivíduos nunca foi testado para o HIV. A prevalência da infecção, entre os que fizeram o teste alguma vez, foi de 11% (Carvalho et al., 2011, 2013), um valor muito próximo do obtido (10,3%) num outro estudo conduzido entre 2010 e 2011 (Fuertes et al., 2012).

O primeiro estudo de incidência alguma vez realizado na população de HSH em Portugal (Campos et al., 2014), com base na *Lisbon Cohort of MSM* (LCM), reporta uma taxa de incidência de 3,35/100 pessoas-ano e apresenta como preditores independentes de seroconversão para o HIV a prática, nos últimos doze meses, de relações sexuais com trabalhadores do sexo ou homens já seropositivos para o HIV e o uso de drogas de recreio antes ou durante as relações sexuais. A LCM, estabelecida em Abril de 2011, consiste num estudo prospectivo observacional conduzido num centro comunitário de testagem voluntária e aconselhamento para o HIV, denominado CheckpointLX (<http://www.checkpointlx.com/>), mantido pelo GAT – “Grupo Português de Activistas sobre Tratamentos de VIH/SIDA Pedro Santos”. Este centro providencia, em Lisboa, um serviço anónimo, confidencial e gratuito, dirigido a HSH, para rastreio rápido da infecção pelo HIV, disponibilizando simultaneamente um aconselhamento personalizado pré e pós-teste e promovendo o acesso à prevenção e à saúde sexual nesta comunidade. Dados mais actualizados desta mesma coorte, baseados em observações efectuadas num período de três anos (entre 2011 e 2014), recentemente publicados, apontam para uma seroincidência de 2,80/100 pessoas-ano (Meireles et al., 2015a, b), um valor significativo. Em 2013, a taxa de conhecimento sobre o estatuto serológico relativo ao HIV foi relativamente elevada, com 73% dos indivíduos confirmando a realização de um teste no último ano. Por outro lado, a utilização de preservativo durante a última relação sexual de tipo anal foi reportada por apenas 70% dos HSH, o que reforça a importância da implementação de acções eficazes de sensibilização para a protecção e de vigilância epidemiológica com recurso a métodos alternativos, de maior aceitabilidade.

Como se viu anteriormente, as taxas de novas infecções pelo HIV nos HSH estão a subir, principalmente nos países desenvolvidos do hemisfério Norte. Este facto terá uma explicação multifactorial, incluindo alterações recentes de comportamento, motivadas, em alguns países, por uma percepção individual de que a infecção é tratável e não necessariamente fatal, e, noutros países, pelo difícil acesso dos HSH a serviços de prevenção e tratamento (Bozicevic et al., 2013). Entre 2003 e 2012, os casos reportados de HSH seropositivos, com idades entre os 20 e os 29 anos, duplicaram (Janiec et al., 2013). É de salientar que as novas infecções surgem maioritariamente de casos de transmissão a partir de indivíduos que ainda não foram diagnosticados (Carvalho et al.,

2013), evidenciando a necessidade de manutenção, mesmo nos países desenvolvidos, de programas de vigilância, prevenção, diagnóstico e aconselhamentos médico e psicológico. Uma das maiores limitações identificadas para a implementação de estudos de vigilância epidemiológica ou de prevalência do HIV na Europa, refere-se ao facto da obtenção dos resultados estar dependente da realização de testes de rastreio para a pesquisa de anticorpos anti-HIV a partir de amostras de sangue obtidas por métodos invasivos, pouco aceitáveis para alguns indivíduos (Bozicevic et al., 2013). Assim, torna-se evidente a necessidade de adaptação dos algoritmos de testagem actualmente existentes, baseados na colheita de amostras de sangue, a produtos biológicos alternativos e de mais fácil obtenção, como, por exemplo, o fluido oral.

O estudo aqui realizado, inserido na participação portuguesa no projecto colaborativo europeu SIALON II, cujo objectivo primordial consiste na promoção da prevenção das infecções sexualmente transmissíveis (IST) entre os HSH, nomeadamente a transmissão do HIV (ver capítulo Resultados), tinha como objectivos específicos: i) detectar, para efeitos de vigilância, a infecção pelo HIV, em HSH, na área da Grande Lisboa, com base na pesquisa de anticorpos anti-HIV no fluido oral, utilizando um algoritmo diagnóstico com dois testes imunoenzimáticos sucessivos; ii) caracterizar geneticamente o HIV circulante em HSH na área da Grande Lisboa, por análise filogenética automatizada de sequências nucleotídicas do gene *pol*, mais especificamente, da região codificante da transcriptase reversa (RT), bem como a presença de eventuais polimorfismos genéticos naturais associados à diminuição da susceptibilidade aos anti-retrovirais inibidores da RT.

A amostra em estudo foi constituída por 409 amostras de fluido oral de HSH, com idades compreendidas entre os 19 e 76 anos, da Área Metropolitana de Lisboa, maioritariamente (60%) de nacionalidade portuguesa, colhidas, de modo voluntário e após obtenção de consentimento informado, em locais de reunião habitual de HSH. Embora não tenha sido possível aceder à informação clínica e respectivo historial correspondente a cada um dos participantes, teve-se acesso a dados básicos, de natureza sócio-demográfica, generalizados, relativos à população-alvo. A esmagadora maioria dos participantes (92,4%) possuía um nível de escolaridade elevado (secundário, pós-secundário não superior e superior), ou seja, é uma população que aparenta ter um nível

social médio a elevado, tendo, teoricamente, acesso com maior facilidade aos meios de comunicação que são dos principais veículos de transmissão de informação associada à divulgação de programas de prevenção da transmissão e de promoção de práticas sexuais seguras, relativamente ao HIV, consequentemente, indivíduos que terão um maior conhecimento relativo à transmissão e métodos preventivos. O estudo básico sobre comportamentos e atitudes face a esta infecção (em <http://www.sialon.eu/en/>) revelou que aproximadamente metade da população em estudo tinha sido testada para a infecção pelo HIV, nos últimos doze meses, tendo conhecimento do resultado do teste, estando informada quanto à prevenção da transmissão deste vírus. Estes dados demonstram que os indivíduos aparentam possuir alguma acessibilidade a programas de prevenção desta infecção, incluindo os métodos e práticas essenciais para minimizar a transmissão. Relativamente à proporção de indivíduos que reporta um teste positivo para HIV e/ou uma IST recente, esta é relativamente elevada (8%), indiciando, muito provavelmente, a prática de comportamentos sexuais de risco.

Como se viu, um dos grandes entraves ao diagnóstico da infecção pelo HIV é o facto deste implicar, na maioria das vezes, a utilização de um método invasivo, a colheita de sangue, para a detecção do estatuto serológico de um indivíduo. Para contornar este problema, têm sido apresentadas novas opções de métodos de diagnóstico, baseados em outro tipo de amostras biológicas, como o exemplo do fluido oral, evitando a colheita invasiva. A utilização do fluido oral para a detecção de anticorpos anti-HIV foi descrita pela primeira vez por Archibald et al. (1986a, b) e Parry et al. (1987), tendo sido demonstrada, desde logo, a sua validade por estudos de inúmeros autores (revisto em Hodinka et al., 1998), incluindo no contexto do diagnóstico da infecção pelo HIV-2 (Gersh-Damet et al., 1992; Azinheira et al., 1994; Saville et al., 1997). Apesar disso, a grande maioria de testes licenciados para o diagnóstico desta infecção apenas tem sido avaliada e validada para soro, plasma ou sangue total, com base em fundamentos de base económica e na premissa, não comprovada, dos testes baseados no fluido oral terem necessariamente sensibilidades e especificidades mais reduzidas (Fransen et al., 2013). A utilização do fluido oral apresenta diversas vantagens, entre as quais, uma maior adesão por parte dos indivíduos interessados, ausência de manipulação de sangue e de agulhas possivelmente contaminadas, representando um menor risco para os técnicos de saúde, e um

processamento mais simplificado da amostra, mantendo esta, ainda assim, uma elevada estabilidade no ambiente.

A definição de “fluido oral” é, frequentemente, bastante dúbia, sendo este muitas vezes confundido com a saliva (de facto, é um dos seus componentes). A saliva constitui uma amostra biológica de natureza muito complexa, de composição muito diferente da do sangue, mas igualmente distinta relativamente ao fluido oral, e que desempenha importantes funções. Na sua composição incluem-se as secreções das glândulas salivares, material celular, de origem e composição muito diversas (e.g., células epiteliais da mucosa, leucócitos, células bacterianas e fúngicas), e restos alimentares (Singh et al., 2013). Um grande número de moléculas orgânicas presentes no plasma (e.g. imunoglobulinas, albumina, hormonas) são igualmente encontradas na saliva, sendo que estas têm muito maior concentração no transudado sérico da mucosa oral, especialmente ao nível da região crevicular, entre os dentes e as gengivas, local de origem do fluido crevicular gengival (neste trabalho, considerado homólogo de “fluido oral”). Assim, a saliva, não sendo um simples ultra-filtrado do plasma, reflecte, de certo modo, a sua composição. A saliva humana tem um conteúdo em proteínas compreendido entre 0,5 e 3 mg/ml, incluindo, naturalmente, proteínas com funções de defesa, implicadas em mecanismos específicos (e.g. imunoglobulinas, em especial a IgA secretória) ou não específicos (e.g. cistatinas, lisozima, lactoferrina, sialoperoxidase) (Singh et al., 2013). Embora a sua concentração em IgG seja menor do que a do plasma, é ainda assim considerada suficiente para permitir o diagnóstico de uma série de patologias de natureza infecciosa (Hofman, 2001; van Doornum et al., 2001; Vyse et al., 2001; Hutse et al., 2005). Logo, a saliva tem sido considerada como um produto biológico de eleição para o diagnóstico imunológico de doenças humanas, em particular as de natureza infecciosa, como no caso do HIV. Neste caso, a utilização do fluido oral, de composição ainda mais próxima da do plasma, obtido do transudado da mucosa oral, especialmente na região crevicular gengival, permite o estabelecimento de algoritmos de teste com elevadas taxas de sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da infecção, baseados num número já considerável de estudos (Hodinka et al., 1998; Chohan et al., 2001; Delaney et al., 2006; Hamers et al., 2008; Zelin et al., 2008; Birrell et al., 2010; Pavie et al., 2010; Fransen et al., 2013; Staneková et al., 2014). Este tipo de amostra requer, no entanto, cuidados específicos na sua colheita,

pois tanto o volume, como a natureza da amostra obtida, podem ser muito variáveis, sendo necessário assegurar uma quantidade e qualidade mínimas, em termos de concentração de imunoglobulinas.

Para a implementação do algoritmo escolhido para a detecção da presença de anticorpos anti-HIV no fluido oral dos indivíduos participantes neste estudo de vigilância epidemiológica, baseado em Fransen et al. (2013) e nos resultados do projecto SIALON I (Mirandola et al., 2009), foram seleccionados dois testes imunoenzimáticos de tipo ELISA, um de terceira geração, *Genscreen™ HIV-1/2 Version 2* (Bio-Rad, França), e outro de quarta geração, *Vironostika® HIV Ag/Ab* (bioMérieux, França), aplicado sequencialmente apenas nas amostras reactivas no primeiro. No projecto europeu SIALON I, o primeiro *kit* fora utilizado para a pesquisa de anticorpos anti-HIV no fluido oral, sendo o seu desempenho avaliado por comparação dos resultados obtidos em 504 amostras emparelhadas com o soro do mesmo indivíduo, colhidas em seis países europeus. Este estudo comparativo revelou uma sensibilidade e uma especificidade de 99% no que se refere à pesquisa de anticorpos no fluido oral (Mirandola et al., 2009), o que veio a legitimar a sua utilização no projecto SIALON II. Um estudo comparativo adicional (Fransen et al., 2013) validou a inclusão do segundo *kit* acima mencionado, como teste de confirmação, no algoritmo implementado. A fim de salvaguardar a qualidade mínima das amostras de fluido oral em teste, foram efectuados doseamentos de IgGs nas amostras com resultado inicialmente negativo (rastreo) ou discrepante, de modo a aplicar-se um critério objectivo de inclusão.

Relativamente aos resultados obtidos, tendo em conta o algoritmo referido, de um total de 409 amostras, 9% (n=37) foram excluídas pelo facto de conterem um teor estimado de IgGs inferior ao limite estabelecido para integrar este estudo (3,5 mg/L), ficando então a amostra de trabalho com um conjunto total de 372 amostras de fluido oral (taxa de inclusão de 91%). Esta taxa de exclusão pode considerar-se algo elevada e para ela podem ter concorrido várias razões. Desde logo, a própria natureza das amostras, muito contaminadas e nas quais foi frequente encontrar resíduos alimentares de refeições anteriores, e respectiva colheita, factos que dificultam a obtenção específica do fluido oral rico em IgGs. O facto de existir a possibilidade de ser colhida uma

amostra constituída maioritariamente por saliva, mais viscosa e muito menos rica em IgGs, diminuindo significativamente a sua concentração, poderá ter concorrido para esta taxa elevada de exclusões, considerando até que, no momento da colheita, é quase impossível detectar a diferença entre os dois tipos de fluidos. Também o volume pretendido é outro dos potenciais obstáculos, pois, por ser o próprio participante a efectuar a colheita da amostra, há uma maior probabilidade de não ser obtido o volume desejado, influenciando também o resultado final. Para um grande número de amostras, o volume de fluido oral recuperado estava longe dos volumes descritos na literatura (0,5-1,5 ml) para sistemas de colheita análogos ao utilizado (Mortimer e Parry, 1991), o que poderá ter constituído um factor limitante. Por fim, não se poderá de todo excluir a eventual introdução de erros experimentais durante a execução, inteiramente manual, dos testes ELISA para o doseamento das IgGs no fluido oral, dado este constituir um processo moroso, o número elevado de amostras a testar e a grande quantidade de manipulações envolvidas na execução. De salientar, no entanto, que todas as amostras excluídas do estudo foram testadas pelo menos duas vezes e que no projecto SIALON I foi reportada uma taxa global de exclusão de amostras de fluido oral de 5,2%, mas com uma das cidades participantes (Bucareste, Roménia) a reportar um valor mais elevado do que o nosso (13,3%) (Mirandola et al., 2009).

No conjunto de 372 amostras de fluido oral validadas, foi possível detectar a presença de anticorpos anti-HIV em 121, com recurso ao primeiro teste ELISA utilizado (*GenscreenTM HIV-1/2 Version 2*, Bio-Rad), enquanto a fase de confirmação destes resultados iniciais, recorrendo ao segundo teste ELISA (*Vironostika[®] HIV Ag/Ab*, bioMérieux), demonstrou que apenas 69 daquelas amostras seriam efectivamente positivas (nível de concordância de 57%). Este nível de discrepância foi considerado muito elevado e, sempre que possível, as amostras com resultados discordantes foram retestadas para confirmação. Comparativamente, o primeiro teste tem uma especificidade inferior (97,6% vs. 100%), embora sensibilidade superior (100% vs. 97,8%), relativamente ao segundo, na sua utilização para a pesquisa de anticorpos anti-HIV no fluido oral (Fransen et al., 2013), podendo por isso ter existido alguma discrepância nos resultados obtidos em ambos os ensaios. No entanto, estas diferenças não parecem tão significativas que justifiquem uma discordância tão elevada. Para além de alguns aspectos já mencionados, nomeadamente o número muito elevado de

amostras processadas de um modo inteiramente manual, que poderão ter influenciado a consistência dos resultados obtidos, neste caso, um dos pontos limitantes poderá ter estado relacionado com a uma incorrecta homogeneização das amostras, antes dos testes. A sua natureza mais ou menos viscosa poderá ter influenciado os resultados, principalmente quando levamos em consideração a utilização de amostras previamente congeladas. Relativamente à quantificação do número de amostras positivas para a presença de anticorpos anti-HIV ($n=69$), podemos, ainda assim, aceitar estes resultados como bastante fiáveis, uma vez que, segundo o algoritmo de teste adoptado, uma amostra para ser considerada positiva tem que obter um resultado positivo, consecutivo, nos dois testes utilizados, um de terceira e outro de quarta geração. Assim, a taxa de detecção de anticorpos anti-HIV em amostras de fluido oral de HSH da Grande Lisboa foi 18,5% (69 amostras positivas/372 amostras validadas), um valor bastante alto. Como é evidente, este valor poderá estar a ser influenciado pelo número elevado de amostras que foram excluídas do estudo por não atingirem uma concentração aceitável de IgGs. Ainda assim, mesmo que não tivesse havido qualquer amostra excluída, ou o seu número fosse consideravelmente inferior, a taxa de detecção de anticorpos anti-HIV teria sempre um valor mínimo de 16,9%. Embora as comparações directas não sejam legítimas, dadas as diferenças de metodologia, objectivos de teste e, principalmente, natureza das amostras (fluido oral vs. plasma/soro), o valor encontrado é mais elevado do que as prevalências estimadas de infecção pelo HIV em populações portuguesas de HSH, reportadas em estudos anteriores, e que variavam, na sua maioria, entre 10-12% (Fuertes et al., 2011, 2012; Carvalho et al., 2011, 2013). Digno de nota, no entanto, que um valor de prevalência para HIV na mesma ordem de grandeza (17,0%) foi reportado para os HSH da cidade de Barcelona, Espanha, durante o projecto SIALON I (Mirandola et al., 2009). Este primeiro grande estudo à escala europeia, realizado entre 2008 e 2009, incluindo HSH de seis cidades diferentes, revelou uma situação bastante heterogénea, relativamente às prevalências encontradas, provavelmente como reflexo de diferenças significativas de atitudes e comportamentos, ou de acesso ao diagnóstico e/ou a programas de prevenção, entre os HSH dos diferentes países europeus envolvidos no estudo. Para além do valor máximo, mencionado acima, para Barcelona (17,0%), as restantes prevalências variaram entre 11,8%, para Verona, Itália, e um mínimo de 2,6%, estimado para Praga, República Checa (Mirandola et al., 2009). Para Barcelona, um

estudo anterior tinha até reportado um valor superior de prevalência da infecção por HIV entre HSH, embora com a limitação de ser baseado numa amostra de conveniência (CEEISCAT, 2008).

Por fim, ao não ter sido possível ter acesso a um historial epidemiológico e clínico detalhado de cada um dos participantes, torna-se difícil retirar quaisquer ilações relativas à prática de comportamentos de risco, eventuais períodos de terapêutica anti-retroviral e estádios de infecção. Estes são alguns dos factores que seria importante conhecer para a discussão dos resultados obtidos, na medida em que poderiam ter impacto no sucesso da detecção dos anticorpos anti-HIV no fluido oral. Por exemplo, alguns dos participantes poderiam estar em “período janela”, ou seja, período de tempo que decorre entre a infecção e a detecção de anticorpos anti-HIV, ou sob terapêutica.

Apesar das melhorias atingidas nos últimos anos, o HIV continua a ser um problema de saúde global. A diversidade genética elevada é uma das suas características fundamentais e tem importantes implicações a níveis diversos, nomeadamente, desenvolvimento de uma vacina, diagnóstico laboratorial e monitorização da infecção, transmissibilidade e patogénese, terapia anti-retroviral e epidemiologia (Rambaut et al., 2004; Hemelaar, 2013). Vários factores contribuem para a extensa selecção de novas variantes genéticas do vírus, incluindo as altas taxas de mutação e recombinação que ocorrem durante o ciclo replicativo, potenciadas por uma rápida e constante replicação viral e pela pressão selectiva exercida pelo sistema imunitário do hospedeiro e, eventualmente, pela terapêutica anti-retroviral (Hemelaar, 2012, 2013). A análise filogenética do genoma completo de numerosas estirpes virais permitiu a classificação do HIV-1 em 4 grupos, 9 subtipos, diversos sub-subtipos e formas recombinantes únicas e circulantes (D’Arc et al., 2015). Há descrições contraditórias sobre o impacto diferencial que poderão ter os diferentes grupos e subtipos ao nível da transmissão, patogenia e resposta imunitária, por exemplo, mas continua a ser fundamental a realização de estudos epidemiológicos moleculares, dado que os subtipos moleculares do HIV constituem bons marcadores epidemiológicos que permitem o acompanhamento das tendências temporais e geográficas da pandemia.

A maioria das novas infecções pelo HIV ocorre através das mucosas, em especial das mucosas genital e rectal, com a transmissão via mucosa oral a ser

considerada muito menos comum (Rothenberg et al., 1998). Ainda assim, a cavidade oral constitui o local primordial da transmissão do vírus da mãe infectada para o seu filho, durante a amamentação, ou ainda durante algumas práticas de sexo oral não protegido entre adultos (Kohli et al., 2014). Existem, desde há muito, visões contraditórias sobre quais os alvos celulares do vírus, nestes casos particulares de transmissão. Se, por um lado, vários autores parecem comprovar a infecção directa das células epiteliais das mucosas (Tan et al., 1993; Furuta et al., 1994; Qureshi et al., 1995, 1997; Berlier et al., 2005), ainda que a baixa eficiência e através de mecanismos independentes de CD4, considerando que estas células não o expressam (Liu et al., 2003; Chen et al., 2004), estabelecendo-se assim uma infecção primária, outros partilham a visão alternativa de que o vírus é apenas capturado pelas células epiteliais, sendo subsequentemente transferido para células permissivas da sub-mucosa, muito possivelmente por mecanismos de transcitose (Dezzutti et al., 2001; Khanna et al., 2002; Wu et al., 2003; Kaldensjö et al., 2011; Kohli et al., 2014). Embora o DNA proviral tenha sido detectado nas células epiteliais das mucosas (Liuzzi et al., 1996), a existência de uma infecção produtiva permanece controversa. Assim, procurando contribuir para o assunto e, simultaneamente, no caso de se obterem resultados positivos, para a caracterização genética molecular do HIV em circulação nos HSH da Grande Lisboa, estabeleceu-se um protocolo de amplificação para um fragmento do DNA proviral do HIV-1 a partir dos sedimentos celulares crioconservados obtidos das amostras de fluido oral colhidas para este estudo. De realçar que estes sedimentos, obtidos por centrifugação (ver Material e Métodos), seriam compostos por uma mistura heterogénea de elementos celulares, como, células epiteliais da mucosa oral e gengival (em especial, queratinócitos), leucócitos, células bacterianas da flora comensal, etc., com um grande predomínio expectável para as primeiras.

Para este estudo, com o objectivo de caracterizar geneticamente o HIV circulante no grupo de risco em estudo, procedeu-se à amplificação por *nested*-PCR de um fragmento de 650 pb da região codificante da transcriptase reversa no gene *pol*, nas 69 amostras nas quais tinha sido possível a detecção de anticorpos anti-HIV no fluido oral, recorrendo ao protocolo de Steegen et al. (2006), com adaptações (Videira e Castro, 2010). Face aos primeiros resultados obtidos (pouco específicos), ao longo das diversas tentativas de amplificação foram-se introduzindo algumas alterações, como já

descrito, nomeadamente na temperatura de hibridação dos *primers* ou quantidades de DNA matriz, entre outros parâmetros. Relativamente à temperatura de hibridação, antes de se iniciar o procedimento de amplificação, confirmaram-se as temperaturas de desnaturação (T_M , do inglês *melting temperature*) e de hibridação (T_A , do inglês *annealing temperature*), tendo em conta as sequências nucleotídicas dos seis *primers* que integram o protocolo, considerando as ligações GC e TA que se pretende efectuar. É de destacar que, para uma reacção de amplificação ocorrer com sucesso, é necessário que exista a hibridação correcta dos *primers* com a sequência alvo, particularmente quando se trata de genomas com elevada variabilidade genética como é o exemplo do HIV-1. Se T_A for muito inferior a T_M , há uma maior probabilidade de ocorrer hibridação inespecífica, pela ligação a outros locais para além da sequência alvo, mas, por outro lado, se a T_A for muito próxima da T_M , pode não ocorrer hibridação, pelo que o ideal, para começar, será que ambas as temperaturas difiram cerca de 5 °C. É ainda de referir que nestas experiências de amplificação foi utilizado um sistema enzimático comercial (*NZYTaq 2x Green Master Mix*, NZYTech, Portugal) que requer pouca manipulação, o que diminui o risco de contaminação. Para além disso, efectuou-se a preparação das soluções-mãe de misturas de PCR na câmara de fluxo laminar, em área diferente daquela onde se adicionava o material genético matriz para amplificação, bem como onde decorriam as reacções de amplificação.

Das 69 amostras em que foram efectuadas as reacções por *nested*-PCR, apenas se conseguiu obter três produtos de amplificação, de tamanho esperado ou aproximado, correspondentes a três amostras de fluido oral de indivíduos diferentes (amostras números 13, 44 e 82). Uma proporção considerável das reacções deu origem a resultados de amplificação pouco específicos, mesmo após a implementação de algumas experiências de optimização [e.g. introdução do reagente optimizador *NZYTaq 5x Optimizer Solution* (NZYTech, Portugal), implementação de protocolos de amplificação de maior restringência, alteração da concentração de DNA matriz], ou resultados negativos. Os primeiros poderão dever-se ao facto das amostras terem grandes quantidades de DNA de origem humana e, muito provavelmente, à presença de bactérias, fungos ou outros contaminantes biológicos da amostra de fluido oral, sendo, portanto, difícil manter a especificidade de hibridação dos *primers*. Por outro lado, os resultados negativos poderão corresponder a verdadeiros negativos, corroborando a

ausência de DNA proviral do HIV-1 no genoma destas células da cavidade oral, ou ser resultado da presença de inibidores de amplificação, considerando a natureza destas amostras biológicas. Não se poderá igualmente descartar a hipótese, muito provável para os que tinham conhecimento prévio do seu estatuto serológico para o HIV, destes indivíduos se encontrarem sob terapia anti-retroviral (dado desconhecido), concorrendo isto para uma carga proviral muito baixa e maiores dificuldades na amplificação. Por fim, podem também ter ocorrido diferenças na sequência nucleotídica dos *primers* relativamente à sequência alvo, não sendo possível obter-se produtos de amplificação, embora esta seja uma hipótese menos plausível, dada a utilização anterior, muito bem-sucedida, destes mesmos *primers* em protocolos de amplificação e caracterização genética do HIV-1 (Steege et al., 2006; Videira e Castro, 2010).

Como os três produtos de amplificação obtidos revelaram uma quantidade reduzida de DNA e/ou presença de bandas inespecíficas, optou-se por efectuar a clonagem prévia dos fragmentos pretendidos no vector plasmídico *pGEM[®]-T Easy* (Promega, EUA), antes do seu envio para sequenciação nucleotídica. Este é um vector universal, de fácil utilização, e que possui diversas características que simplificam o processo de clonagem, como foi referido no capítulo de Material e Métodos. Em primeiro lugar, o facto de este vector ser flanqueado por extremidades protuberantes 3' de timidina, permite a sua manutenção sob a forma linear, evitando-se a recircularização. Depois, também possibilita uma selecção eficiente e fácil de clones bacterianos transformantes recombinantes putativos pelo sistema de α -complementação. Por último, apresenta nas extremidades da região de clonagem múltiplas sequências de reconhecimento para várias endonucleases de restrição (e.g. EcoRI), facilitando o rastreio final dos possíveis recombinantes.

Para a selecção dos clones bacterianos transformantes recombinantes putativos, baseando-se no sistema de α -complementação, utilizou-se como meio de selecção o meio LB sólido, com ampicilina (antibiótico que tem como função seleccionar as bactérias transformadas com o vector plasmídico), IPTG e X-gal. O IPTG induz a produção de β -galactosidase, via expressão do gene *lacZ*, no cromossoma bacteriano, e, após complementação com o produto do gene *lacZ'* presente no plasmídeo, degrada o composto cromogénico X-gal, conferindo uma coloração azul a essas colónias. Se, no

entanto, a grelha aberta de leitura do gene *lacZ'* for interrompida pela inserção de um fragmento de DNA no vector plasmídico, não há produção de β -galactosidase, nem degradação do X-gal, ou seja, surgem colónias de coloração branca.

Após extracção, purificação e hidrólise com EcoRI dos plasmídeos recombinantes putativos, correspondentes às três experiência de clonagem em curso, foram observados em gel de agarose os padrões de restrição obtidos, entre os quais, alguns claramente indicadores da clonagem dos fragmentos de DNA pretendidos, em particular, para as amostras 13 e 44. No caso da amostra 82, não se alcançou o resultado pretendido, pois apenas foi possível visualizar um fragmento de DNA, de aproximadamente de 3000 pb, correspondente ao plasmídeo linearizado, sendo então excluído o seu envio para sequenciação. Quanto às amostras 13 e 44, o padrão de restrição obtido foi genericamente semelhante em todos os clones estudados, tendo-se obtido dois fragmentos de DNA, um correspondente ao vector plasmídico linearizado e outro relativo ao fragmento de DNA em estudo. Na amostra 13, todos os fragmentos inseridos aparentavam ter o mesmo tamanho aproximado, entre 700-750 pb, enquanto na amostra 44, os fragmentos clonados apresentavam tamanhos mais diversos, compreendidos entre os 500 e os 800 pb. Foi, deste modo, desde logo, possível verificar a ausência de um padrão que indiciasse a clonagem de um fragmento de 650 pb, resultado da amplificação por PCR de uma região codificante da transcriptase reversa do gene *pol* de HIV-1. Procedeu-se, ainda assim, ao envio para sequenciação nucleotídica de dois dos clones recombinantes com origem na amostra 13 e de quatro relativos à amostra 44.

As seis sequências nucleotídicas obtidas foram editadas e utilizadas para pesquisa de regiões de semelhança local, entre as sequências depositadas na base de dados do *GenBank*, com recurso ao programa informático *BLAST*, com o intuito de se proceder à sua identificação presuntiva. Confirmando a observação anterior de que os amplicões obtidos por PCR não correspondiam aos tamanhos teóricos esperados (650 pb), os resultados da pesquisa rápida de regiões de semelhança local com recurso ao programa *BLAST* não confirmaram a presença de DNA proviral do HIV-1 em nenhuma das amostras de fluido oral (13 e 44). Ao invés, comprovaram sim a amplificação inespecífica de fragmentos de DNA genómico de bactérias da flora comensal da boca,

ou tracto orofaríngeo humano, ou ainda de bactérias consideradas agentes oportunistas (provavelmente, mais fluorescentes nesta população de indivíduos infectados pelo HIV), dos géneros *Streptococcus*, *Leptotrichia* e *Capnocytophaga*. Não houve, portanto, quaisquer amostras de fluido oral consideradas positivas para a presença de DNA proviral do HIV-1. Embora com algumas limitações, estes resultados parecem corroborar a hipótese das células epiteliais da mucosa oral, a população celular predominante nos sedimentos celulares obtidos, não suportarem uma infecção pelo HIV-1.

Como se pode verificar, não foi possível atingir-se todos os objectivos inicialmente propostos para este trabalho, nomeadamente, o da caracterização genética do HIV circulante em HSH na área da Grande Lisboa, recorrendo às células epiteliais da mucosa oral presentes nas amostras de fluido oral. A taxa de sucesso na amplificação de amplicões aparentemente específicos foi baixa (3/69) e, mesmo assim, estes revelaram não corresponder a material genómico do HIV, mas antes a bactérias presentes na flora comensal oral. A natureza das amostras utilizadas, onde foi possível detectar, algo frequentemente, restos alimentares e outros, pode ter concorrido para parte do insucesso das amplificações. Não se pode, no entanto, descartar a hipótese destas células (maioritariamente, queratinócitos da mucosa oral) não se encontrarem efectivamente infectadas ou não suportarem uma infecção pelo HIV, tese que é defendida por um grande grupo de autores, como mencionado anteriormente. Quanto ao estudo de vigilância epidemiológica, propriamente dito, embora com algumas limitações, já discutidas, foi possível detectar a presença de anticorpos anti-HIV em amostras de fluido oral de HSH da Área Metropolitana de Lisboa em 18,5% dos casos testados. Devido a eventuais limitações de representatividade da amostra, questões metodológicas e de índole técnica, este valor não poderá ser considerado directamente como uma prevalência de infecção nesta população. No entanto, devido às suas características sócio-comportamentais, o valor de prevalência real será seguramente muito elevado. Concluindo, o valor obtido para a taxa de detecção tem de ser avaliado com o máximo de precaução pois não pode ser interpretado como um retrato específico de prevalência nos HSH na área da Grande Lisboa. Todos os indivíduos com resultados positivos receberam aconselhamento e são, se assim o desejarem, referenciados para um hospital especializado, a fim de se proceder à colheita sanguínea para confirmação dos

resultados obtidos, com aplicação dos algoritmos de diagnóstico internacionalmente aceites (ver em <http://www.who.int/hiv/pub/guidelines/en/>). Apesar de todas as limitações, a estratégia aqui seguida é, seguramente, uma boa estratégia para a implementação de estudos de vigilância epidemiológica e monitorização de tendências evolutivas da epidemia, particularmente, em populações de difícil acesso, dada a maior facilidade de colheita do fluido oral, comparativamente ao sangue. O grau de aceitação da população-alvo deste projecto para a dádiva de fluido oral foi elevado, o que pode indicar a adequabilidade desta estratégia na implementação de programas de vigilância, no contexto de programas mais latos direccionados para os HSH, potenciando um acesso mais facilitado ao diagnóstico precoce. Um dos problemas ainda por resolver na epidemia portuguesa pelo HIV é o diagnóstico muito tardio de uma fatia considerável das novas infecções. De acordo com os critérios europeus usados na caracterização do diagnóstico tardio (de base mista, imunológica e clínica), verificou-se que 48,0% do total de casos de infecção por HIV diagnosticados em 2013 em Portugal correspondiam a diagnósticos tardios (DDINSA, 2014), embora com uma menor expressão na população HSH, comparativamente com outros grupos de risco.

A incidência da infecção pelo HIV está a aumentar no grupo dos HSH em muitos países europeus, incluindo Portugal, mas também na América do Norte e Austrália (Sullivan et al., 2009; Phillips et al., 2013). Em 2012, os HSH estavam em risco substancial para a infecção pelo HIV em praticamente todos os contextos estudados (Beyrer et al., 2012). Apesar de décadas de investigação e muito esforço e recursos financeiros colocados na prevenção da infecção, valores muito elevados de incidência e prevalência da infecção pelo HIV continuam a ser relatados para os HSH, praticamente em todo o mundo (Beyrer et al., 2010). Em termos globais, a epidemia do HIV está em declínio em muitos países desenvolvidos, incluindo Austrália, Europa Ocidental e EUA, excepto na população de HSH, onde continua a expandir-se, ou mesmo a aumentar, o que tem sido designado como “a epidemia reemergente” (Sullivan et al., 2009). Nos EUA, por exemplo, as estimativas apontam para que a incidência de novas infecções entre HSH esteja a aumentar em cerca de 8% ao ano, desde 2001 (CDC, 2010). Daí que os instrumentos de vigilância devam ser adaptados ao estado actual da epidemia e devam incluir mecanismos de monitorização prospectiva descentralizada da incidência do HIV, bem como das alterações comportamentais, em

populações-chave como os HSH (Meireles et al., 2015b). Tanto quanto possível, estes instrumentos de vigilância devem basear-se em estratégias simples, mas abrangentes, baseadas na recolha de amostras biológicas de fácil acesso, como o fluido oral. No contexto da infecção por HIV, é determinante a simplificação, tanto dos métodos de colheita de amostras biológicas para diagnóstico, como dos projectos de vigilância epidemiológica e de prevenção, essencialmente em populações de difícil acesso, como por exemplo os HSH, focados no presente estudo, mas também os trabalhadores do sexo e indivíduos utilizadores de drogas por via intravenosa.

6. Referências Bibliográficas

Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, P. E., Kennedy, P. M., Murphy & E. A. Berger. (1996) CC CKR5: A RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β Receptor as a Fusion Cofactor for Macrophage-Tropic HIV-1. *Science*. 272. p.1955-1958.

Archibald, D. W., Zon, L. I., Groopman, J. E., Allan, J. S., McLane, M. F. & Essex, M. E. (1986a) Salivary antibodies as a means of detecting human T cell lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus infection. *Journal of Clinical Microbiology*. 24 (5). p.873–875.

Archibald, D. W., Zon, L., Groopman, J. E., McLane, M. F. & Essex M. (1986b) Antibodies to human T-lymphotropic virus type III (HTLV-III) in saliva of acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) patients and in persons at risk for AIDS. *Blood*. 67 (3). p.831–834.

Azinheira, M. P., Santos Pinto, A., Prieto, E., Albuquerque, R. & Canas Ferreira, W. (1994) Detection of antibodies to HIV-2 in the saliva of HIV-2-seropositive subjects. *AIDS*. 8 (6). p.849–850.

Barré-Sinoussi, F., Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W & Montagnier L. (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 220. p.868-871.

Berger, E. A., Doms, R. W., Fenyo, E. M., Korber, B. T. M., Littman, D. R., Moore, J. P., Sattentau, Q. J., Schuitemaker, H., Sodroski & Weiss, R. A. (1998) A new classification for HIV-1. *Nature*. 391. p.240.

Berlier, W., Bourlet, T., Lawrence, P., Hamzeh, H., Lambert, C., Genin, C., Verrier, B., Dieu-Nosjean, M. C., Pozzetto, B. & Delézay, O. (2005) Selective sequestration of X4 isolates by human genital epithelial cells: Implication for virus tropism selection process during sexual transmission of HIV. *Journal of Medical Virology*. 77 (4). p.465–474.

- Beyrer, C., Baral, S. D., van Griensven, F., Goodreau, S. M., Chariyalertsak, S., Wirtz, A. L. & Brookmeyer, R. (2012) Global epidemiology of HIV infection in men who have sex with men. *Lancet*. 380 (9839). p.367-377.
- Beyrer, C., Baral, S. D., Walker, D., Wirtz, A. L., Johns, B. & Sifakis, F. (2010) The expanding epidemics of HIV-1 among men who have sex with men in low- and middle-income countries: diversity and consistency. *Epidemiologic Reviews*. 32 (1). p.137–151.
- Birnboim, H.C., & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. 7. p.1513-1523.
- Birrell, F., Staunton, S., Debattista, J., Roudenko, N., Ruthkin, W. & Davis, C. (2010) Pilot of non-invasive (oral fluid) testing for HIV within a community setting. *Sexual Health*. 7 (1). p.11–16.
- Bitrus, H. J. & Okechukwu, I. B. (2015) Spatiotemporal dynamics of HIV distribution pattern and application of indigenous bioresources and microbicides in expanding preventive options. In Okechukwu, I. B. (ed.). *Trends in basic and therapeutic options in HIV infection - towards a functional cure*. Rijeka: InTech. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5772/61000>.
- Bozicevic, I., Handanagic, S., Lepej, S. Z. & Begovac, J. (2013) The emerging and re-emerging human immunodeficiency virus epidemics in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*. 19 (10). p.917-929.
- Buonaguro, L., Tornesello ML. & Buonaguro FM. (2007) Human Immunodeficiency Virus Type 1 Subtype Distribution in the worldwide Epidemic: Pathogenetic and Therapeutic Implications. *Journal of Virology*. 81(19). p.10209-19.
- Butler IF., Pandrea I., Marx PA., Apetrei C. (2007) HIV Genetic Diversity: Biological and Public Health Consequences. *Current HIV Research*. 5(1). p.23-45.
- Campos, M. J., Brito, J., Cornejo, J., Esteves, J., Ferreira, F., Rocha, L. M., Fuertes, R., Pinto, N., Mendão, L., Martins, A., Lucas, R. & Barros, H. (2014) HIV incidence among MSM in Portugal as a matter of risk management. Comunicação apresentada na

20th International AIDS Conference (AIDS 2014), 20-25 de Julho de 2014, Melbourne, Austrália.

Carvalho, C., Fuertes, R., Lucas, R., Martins, A., Campos, M. J., Mendão, L., Schmidt, A. J. & Barros, H. (2013) HIV testing among Portuguese men who have sex with men – results from the European MSM Internet Survey (EMIS). *HIV Medicine*. 14 (Suppl.3). p.15-18.

Carvalho, C., Fuertes, R., Lucas, R., Mendão, L., Campos, M. J., Barros, H. & Schmidt, A. J. (2011) Portugal in the EMIS study: a general description of study participants. Comunicação apresentada na conferência *The Future of European Prevention among MSM (FEMP 2011)*, 10-11 de Novembro de 2011, Estocolmo, Suécia.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (1981a.) *Pneumocystis pneumonia* – Los Angeles. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 30. p.250-252.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (1981b) Kaposi's sarcoma and *Pneumocystis pneumonia* among homosexual men – New York City and California. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 30. p.305-308.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (1982) Update on acquired immune deficiency syndrome (AIDS) – United States. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 31. p.507-508, p.513-514.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2010) Prevalence and awareness of HIV infection among men who have sex with men - 21 cities, United States, 2008. *MMWR Morbidity and mortality weekly report*. 59 (37). p.1201–1207.

Centre for Sexually Transmitted Infection and AIDS Epidemiological Studies of Catalonia (CEEISCAT). (2008) *Integrated AIDS/HIV/STI Surveillance System of Catalonia (SIVES): biennial epidemiological report*. Barcelona: Generalitat de Catalunya, Departament de Salut. Disponível em: http://www.ceescat.org/Index_Ing.htm.

Chan P. & Kantor R. (2009) Transmitted Drug Resistance in Nonsubtype B HIV-1 Infection. *HIV Ther.* 3(5). p.447-465.

- Chen, H., Zha, J., Gowans, R. E., Camargo, P., Nishitani, J., McQuirter, J. L., Cole, S. W., Zack, J. A. & Liu, X. (2004) Alcohol enhances HIV type 1 infection in normal oral keratinocytes by up-regulating cell-surface CXCR4 coreceptor. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 20 (5). p.513-519.
- Chohan, B. H., Lavreys, L., Mandaliya, K. N., Kreiss, J. K., Bwayo, J. J., Ndinya-Achola, J. O. & Martin, Jr., H. L. (2001) Validation of a modified commercial enzyme-linked immunoassay for detection of human immunodeficiency virus type 1 immunoglobulin G antibodies in saliva. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 8 (2). p.346–348.
- Clavel, F., Guétard D, Brun-Vézinet F, Chamaret S, Rey MA, Santos-Ferreira MO, Laurent AG, Dauguet C, Katlama C & Rouzioux C. (1986) Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*. 233. p.343-346.
- D'arc, M., Ayoub, A., Esteban, A., Learn, G. H., Boué, V., Liegeois, F., Etienne, L., Tagg, N., Leendertz, F. H., Boesch, C., Madinda, N. F., Robbins, M. M., Gray, M., Cournil, A., Ooms, M., Letko, M., Simon, V. A., Sharp, P. M., Hahn, B. H., Delaporte, E., Mpoudi Ngole, E. & Peeters, M. (2015) Origin of the HIV-1 group O epidemic in western lowland gorillas. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 112 (11). p.E1343-E1352.
- Delaney, K. P., Branson, B. M., Uniyal, A., Kerndt, P. R., Keenan, P. A., Jafa, K., Gardner, A. D., Jamieson, D. J. & Bulterys, M. (2006) Performance of an oral fluid rapid HIV-1/2 test: experience from four CDC studies. *AIDS*. 20 (12). p.1655–1660.
- Deng, H., R. Liu, W. Ellmeier, S. Choe, D. Unutmaz, M. Burkhart, P. D. Marzio, S. Marmon, R. E. Sutton, C. M. Hill, C. B. Davis, S. C. Peiper, T. J. Schall, D. R. Littman, & N. R. Landau. (1996) Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*. 381. p.661-666.
- Departamento de Doenças Infecciosas do INSA, Unidade de Referência e Vigilância Epidemiológica; colab. Programa Nacional para a Infecção VIH/SIDA – Direcção-Geral da Saúde. (2014) *Infecção VIH/SIDA: a situação em Portugal a 31 de Dezembro de 2013*. Lisboa: INSA, IP. Disponível em:

http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/2448/3/INSA-Relatorio_Infecao_HIV-SIDA_2013.pdf).

Desai S, Croxford S, Brown AE, Mitchell H, Hughes G & Delpech V. (2015) An overview of the HIV epidemic among men who have sex with men in the United Kingdom, 1999–2013. *Euro Surveill.* 20(14).

Dezzutti, C. S., Guenthner, P. C., Cummins, Jr., J. E., Cabrera, T., Marshall, J. H., Dillberger, A. & Lal, R. B. (2001) Cervical and prostate primary epithelial cells are not productively infected but sequester human immunodeficiency virus type 1. *Journal of Infectious Diseases.* 183 (8). p.1204–1213.

Esteves, A., R. Parreira, J. Piedade, T. Venenno, M. Franco, J. Germano De Sousa, L. Patrício, P. Brum, A. Costa & W. F. Canas-Ferreira. (2003) Spreading of HIV-1 subtype G and envB/gagG recombinant strains among injecting drug users in Lisbon, Portugal. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 19. p.511-517.

Esteves, A., R. Parreira, T. Venenno, M. Franco, J. Piedade, J. Germano De Sousa & W. F. Canas-Ferreira. (2002) Molecular epidemiology of HIV type 1 infection in Portugal: high prevalence of non-B subtypes. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.* 18. p.313-325.

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)/World Health Organization (WHO/OMS). (2014) *HIV/AIDS surveillance in Europe 2013*. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control. Stockholm: ECDC. Disponível em: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/hiv-aids-surveillance-report-Europe-2013.pdf>.

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)/World Health Organization (WHO/OMS). (2013) *HIV/AIDS Surveillance in Europe, 2012*. Stockholm: ECDC. Disponível em: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/hiv-aids-surveillance-report-2012-20131127.pdf>.

- Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedy, & E. A. Berger. (1996) HIV-1 Entry Cofactor: Functional cDNA Cloning of a Seven-Transmembrane, G Protein-Coupled Receptor. *Science*. 272. p.872-877.
- Fransen, K., Vermoesen, T., Beelaert, G., Menten, J., Hutse, V., Wouters, K., Platteau, T. & Florence, E. (2013) Using conventional HIV tests on oral fluid. *Journal of Virological Methods*. 194 (1-2). p.46-51.
- Freed, EO. (2001) HIV-1 Replication. *Somatic Cell and Molecular Genetics*. 26(1-6). p.13-33.
- Fuertes, R., Brito, J., Campos, M. J., Esteves, J. & Coelho, I. (2011) Community-based HIV testing in a gay social venue in Lisbon. Comunicação apresentada na 6th *International AIDS Society Conference on HIV Pathogenesis, Treatment and Prevention (IAS2011)*, 17-20 de Julho de 2011, Roma, Itália.
- Fuertes, R., Gama, A., Rego, I., Mendão, L. & Dias, S. (2012) Demographic and socio-economic factors of HIV testing and sexual risk behavior among Portuguese men who have sex with men (MSM). Comunicação apresentada na *XIX International AIDS Conference (AIDS 2012)*, 22-27 de Julho de 2012, Washington, D.C., EUA.
- Furuta, Y., Eriksson, K., Svennerholm, B., Fredman, P., Horal, P., Jeansson, S., Vahlne, A., Holmgren, J. & Czerkinsky, C. (1994) Infection of vaginal and colonic epithelial cells by the human immunodeficiency virus type 1 is neutralized by antibodies raised against conserved epitopes in the envelope glycoprotein gp120. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 91 (26). p.12559–12563.
- Gartner, S., P. Markovits, D. M. Markovitz, M. H. Kaplan, R. C. Gallo & M. Popovic. (1986) The role of mononuclear phagocytes in HTLV-III/LAV infection. *Science*. 233. p.215-219.
- Geretti, AM. (2006) HIV-1 subtypes: epidemiology and significance for HIV management. *Curr Opin Infect Dis*. 19. p.1-7.
- Gershdy-Damet, G. M., Koffi, K., Abouya, L., Sasson-Morokro, M., Brattegaard, K., Parry, J. V., De Cock, K. M. & Mortimer, P. P. (1992) Salivary and urinary diagnosis of

- human immunodeficiency viruses 1 and 2 infection in Côte d'Ivoire, using two assays. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 86 (6). p.670–671.
- Gottlieb, M., Schroff R., Schanker HM., Weisman JD., Fan PT., Wolf RA., Saxon A. (1981) *Pneumocystis carinii* Pneumonia and Mucosal Candidiasis in Previously Healthy Homosexual Men — Evidence of a New Acquired Cellular Immunodeficiency. *The New England Journal of Medicine*. 305. p.1425-143.
- Granade, T., Phillips, S., Parekh, B., Gomez, P., Kitson-Piggott, W., Oleander, H., Mahabir, B., Charles, W. & Lee-Thomas, S. (1998) Detection of Antibodies to Human Immunodeficiency Virus Type 1 in Oral Fluids: A Large-scale Evaluation of Immunoassay Performance. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 5(2). p.171-175.
- Hahn, B. H., G. M. Shaw, K. M. De Cock, & P. M. Sharp. (2000) AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science*. 287. p.607-614.
- Hamers, R. L., de Beer, I., Kaura, H., van Vugt, M., Caparos, L. & Rinke de Wit, T. F. (2008) Diagnostic accuracy of two oral fluid-based tests for HIV surveillance in Namibia. *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*. 48 (1). p.116–118.
- Hemelaar, J. (2012) The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends in Molecular Medicine*. 18 (3). p.182-192.
- Hemelaar, J. (2013) Implications of HIV diversity for the HIV-1 pandemic. *Journal of Infection*. 66 (5). p.391-400.
- Hirsch, V. M., R. A. Olmsted, M. Murphey-Corb, R. H. Purcell, & P. R. Johnson. (1989) An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature*. 339. p.389-392.
- Hodinka, R., Nagashunmugam, T. & Malamud, D. (1998) Detection of Human Immunodeficiency Virus Antibodies in Oral Fluids. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*. 5(4). p.419-426.
- Hofman, L. F. (2001) Human saliva as a diagnostic specimen. *Journal of Nutrition*. 131 (5). p.1621S–1625S.

- Huet, T, R. Cheynier, A. Meyerhans, G. Roelants, & S. Wain-Hobson. (1990) Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature*. 345. p.356-359.
- Hutse, V., Verhaegen, E., De Cock, L., Quoilin, S., Vandenberghe, H., Horsmans, Y., Michiels, P., Van Damme, P., Van Vlierberghe, H., Claeys, F., Vranckx, R. & Van Oyen, H. (2005) Oral fluid as a medium for the detection of hepatitis B surface antigen. *Journal of Medical Virology*. 77 (1). p.53–56.
- Ibe S, Yokomaku Y, Shiino T, Tanaka R, Hattori J, Fujisaki S, Iwatani Y, Mamiya N, Utsumi M, Kato S, Hamaguchi M & Sugiura W. (2010) HIV-2 CRF01_AB: first circulating recombinant form of HIV-2. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 54. p.241-247.
- Janiec, J., Haar, K., Spiteri, G., Likatavicius, G., van de Laar, M. & Amato-Gauci, A. J. (2013) Surveillance of human immunodeficiency virus suggests that younger men who have sex with men are at higher risk of infection, European Union, 2003 to 2012. *Eurosurveillance*. 18 (48). pii=20644.
- Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). (2013) *Global report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013*. Geneva: UNAIDS.
- Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). (2014) *Global AIDS response progress reporting 2014 (GARPR): construction of core indicators for monitoring the 2011 UN political declaration on HIV/AIDS*. Geneva: UNAIDS.
- Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS). (2014) *The Gap Report*. Geneva: UNAIDS.
- Kaldensjö, T., Petersson, P., Tolf, A., Morgan, G., Broliden, K. & Hirbod, T. (2011) Detection of intraepithelial and stromal Langerin and CCR5 positive cells in the human endometrium: potential targets for HIV infection. *PLoS ONE*. 6 (6). p.e21344.
- Keele, B.F., Heuverswyn, F.V., Li, Y., Bailes, E., Takehisa, J., Santiago, M.L., Bibollet-Ruche, F., Chen, Y., Wain, L. V., Liegeois, F., Loul, S., Ngole, E. M., Bienvenue, Y., Delaporte, E., Brookfield, J. F. Y, Sharp, P. M., Shaw, G. M., Peeters, M., Hahn, B. H.. (2006) Chimpanzee reservoirs of pandemic and nonpandemic HIV-1. *Science*. 313. p.523-526.

- Khanna, K. V., Whaley, K. J., Zeitlin, L., Moench, T. R., Mehrazar, K., Cone, R. A., Liao, Z., Hildreth, J. E., Hoen, T. E., Shultz, L. & Markham, R. B. (2002) Vaginal transmission of cell-associated HIV-1 in the mouse is blocked by a topical, membrane-modifying agent. *Journal of Clinical Investigation*. 109 (2). p.205–211.
- Kohli, A., Islam, A., Moyes, D. L., Murciano, C., Shen, C., Challacombe, S. J. & Naglik, J. R. (2014) Oral and vaginal epithelial cell lines bind and transfer cell-free infectious HIV-1 to permissive cells but are not productively infected. *PLoS ONE*. 9 (5). p.e98077.
- Laar, MJ. & Likatavicius, G. (2009) HIV and AIDS in the European Union, 2008. *Euro Surveill*. 14(47).
- Liu, X., Zha, J., Chen, H., Nishitani, J., Camargo, P., Cole, S. W. & Zack, J. A. (2003) Human immunodeficiency virus type 1 infection and replication in normal human oral keratinocytes. *Journal of Virology*. 77 (6). p.3470-3476.
- Liuzzi, G., Chirianni, A., Clementi, M., Bagnarelli, P., Valenza, A., Cataldo, P. T. & Piazza, M. (1996) Analysis of HIV-1 load in blood, semen and saliva: evidence for different viral compartments in a cross-sectional and longitudinal study. *AIDS*. 10 (14). p.51–56.
- Longo D., Fauci A., Kasper D., Hauser S., Jameson J. & Loscalzo J. (2012) Harrison's *Principles of Internal Medicine*. 17thEd. 182.
- Malamud, D. & Chavez, I. (2011) Saliva as a Diagnostic Fluid. *Dent Clin North Am*. 55(1). p.159-178.
- Marcus, U., Hickson, F., Weatherburn, P. & Schmidt, A. (2012) Prevalence of HIV among MSM in Europe: comparison of self-reported diagnoses from a large scale internet survey and existing national estimates. *BMC Public Health*. 12. p.978.
- Martinez, P., Torres, A., Lejarazu, R., Montoya, A., Martín, J. & Eiros, J. (1999) Human immunodeficiency virus antibody testing by enzyme-linked fluorescent and western blot assays using serum, gingival-crevicular transudate, and urine samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(4). p.1100–1106.

Martins H, Shivaji T, URVE. Infecção VIH/SIDA: a situação em Portugal a 31 de dezembro de 2013 / Departamento de Doenças Infeciosas do INSA. Unidade de Referência e Vigilância Epidemiológica; Programa Nacional para a Infecção VIH/SIDA. Direção-Geral da Saúde. - Lisboa : Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, IP, 2014. - 70 p. : il. - (Documento VIH/SIDA ; 145)

Meireles, P., Lucas, R., Carvalho, C., Fuertes, R., Brito, J., Campos, M. J., Mendão, L. & Barros, H. (2015a). Incident risk factors as predictors of HIV seroconversion in the Lisbon cohort of men who have sex with men: first results, 2011-2014. *Eurosurveillance*. 20 (14). pii=21091.

Meireles, P., Lucas, R., Martins, A., Carvalho, A. C., Fuertes, R., Brito, J., Campos, M. J., Mendão, L. & Barros, H. (2015b). The Lisbon Cohort of men who have sex with men. *BMJ Open*. 5. e007220.

Miller, MD., Hazuda CM. & Bushman FD. (1997) Human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes: studies of organization and composition. *J. Virol*. 71. p.5382-5390.

Mirandola, M., Folch Toda, C., Krampac, I., Nita, I., Staneková, D., Stehliková, D., Toskin, I., Gios, L., Foschia, J. P., Breveglieri, M., Furegato, M., Castellani, E., Bonavina, M. G. & the SIALON network. (2009) HIV bio-behavioural survey among men who have sex with men in Barcelona, Bratislava, Bucharest, Ljubljana, Prague and Verona, 2008-2009. *Eurosurveillance*. 14 (48). pii=19427.

Mortimer, P. P. & Parry, J. V. (1991) Non-invasive virological diagnosis: are saliva and urine specimens adequate substitutes for blood? *Reviews in Medical Virology*. 1 (2). p.73-78.

Palma, A. C., F. Araújo, V. Duque, F. Borges, M. T. Paixão & R. Camacho. (2007) Molecular epidemiology and prevalence of drug resistance-associated mutations in newly diagnosed HIV-1 patients in Portugal. *Infect. Genet. Evol*. 7. p.391-398.

Parisi, M.R., Soldini, L., Vidoni, G., Clemente, F. Mabellini, C. & Belloni, T. (2013) Cross-sectional study of community serostatus to highlight undiagnosed HIV infections

with oral fluid HIV-1/2 rapid test in non-conventional settings. *New Microbiologica*. 36. p.121-132.

Parry, J. V., Perry, K. R. & Mortimer, P. P. (1987) Sensitive assays for viral antibodies in saliva: an alternative to tests on serum. *Lancet*. 2 (8550). p.72–75.

Pavie, J., Rachline, A., Loze, B., Niedbalski, L., Delaugerre, C., Laforgerie, E., Plantier, J.-C., Rozenbaum, W., Chevret, S., Molina, J.-M. & Simon, F. (2010) Sensitivity of five rapid HIV tests on oral fluid or finger stick whole blood: a real-time comparison in a healthcare setting. *PLoS ONE*. 5 (7). p.e11581.

Phillips, A. N., Cambiano, V., Nakagawa, F., Brown, A. E., Lampe, F., Rodger, A., Miners, A., Elford, J., Hart, G., Johnson, A. M., Lundgren, J. & Delpech, V. C. (2013) Increased HIV incidence in men who have sex with men despite high levels of ART-induced viral suppression: analysis of an extensively documented epidemic. *PLoS ONE*. 8 (2). p.e55312.

Pink, R., Simek, J., Vondrakova, J., Faber, E., Michl, P., Pazdera, J. & Indrak, K. (2009) Saliva as a Diagnostic Medium. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 153(2). p.103–110.

Public Health Laboratory Issues in Brief (APHL). (2013) Testing Oral Fluid for the Presence of HIV Antibodies.

Qureshi, M. N., Barr, C. E., Hewlitt, I., Boorstein, R., Kong, F., Bagasra, O., Bobroski, L. E. & Joshi, B. (1997) Detection of HIV in oral mucosal cells. *Oral Diseases*. 3 (Suppl.1). p.S73-S78.

Qureshi, M. N., Barr, C. E., Seshamma, T., Reidy, J., Pomerantz, R. J. & Bagasra, O. (1995) Infection of oral mucosal cells by human immunodeficiency virus type 1 in seropositive persons. *Journal of Infectious Diseases*. 171 (1). p.190-193.

Rambaut, A., Posada, D., Crandall, K. A. & Holmes, E. C. (2004) The causes and consequences of HIV evolution. *Nature Reviews Genetics*. 5 (1). p.52-61.

- Ribeiro AC, Maia e Silva A, Santa-Marta M, Pombo A, Moniz-Pereira J, Goncalves J & Barahona I. (2005) Functional analysis of Vif protein shows less restriction of human immunodeficiency virus type 2 by APOBEC3G. *J. Virol.* 79(2). p.823-33.
- Rothenberg, R. B., Scarlett, M., del Rio, C., Reznik, D. & O'Daniels, C. (1998) Oral transmission of HIV. *AIDS.* 12 (16). p.2095–2105.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 74(12). p.5463–5467.
- Saville, R. D., Constantine, N. T., Holm-Hansen, C., Wisnom, C., DePaola, L. & Falkler, W. A., Jr. (1997) Evaluation of two immunoassays designed to detect HIV antibodies in oral fluids. *Journal of Clinical Laboratory Analysis.* 11 (1). p.63–68.
- Schramm, W., Angulo, G. B., Torres, P.C., & Burgess-Cassler, A. (1999) A Simple Saliva-Based Test for Detecting Antibodies to Human Immunodeficiency Virus. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. American Society for Microbiology.* 6(4). p. 577-580.
- Sharp, P. & Hahn, B. (2010) The evolution of HIV-1 and the origin of AIDS. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 365(1552). p.2487-94.
- Sharp, P. & Hahn, B. (2011) Origins of HIV and the AIDS Pandemic. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 1(1).
- SIALON II Project. (2013) Manual for HIV-testing from oral fluids in TLS study. Ed. EU-funded project “Capacity building in combining targeted prevention with meaningful HIV surveillance among MSM”. Berlin, Alemanha.
- SIALON II. Hospital Universitário de Verona. Acedido em 16 de Fevereiro 2014, em: <http://www.sialon.eu/en/home/>.
- Sierra S., Kupfer B & Kaiser R. (2005) Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *Journal of Clinical Virology.* 34. p.233–244.

- Singh, M., Singhal, U., Bhasin, G. K., Panday, R. & Aggarwal, S. K. (2013) Oral fluid: Biochemical composition and functions: A review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*. 37 (37). p.1932-1941.
- Staneková, D., Kramárová, P., Wimmerová, S., Hábeková, M., Takáčová, M. & Mojzesová, M. (2014) HIV and risk behaviour among men who have sex with men in Slovakia (2008-2009). *Central European Journal of Public Health*. 22 (4). p.239-244.
- Steege, K., Demecheleer, E., De Cabooter, N., Nges, D., Temmerman, M., Ndumbe, P., Mandaliya, K., Plum, J. & Verhofstede, C. (2006) A sensitive in-house RT-PCR genotyping system for combined detection of plasma HIV-1 and assessment of drug resistance. *Journal of Virological Methods*. 133 (2). p.137-145.
- Sullivan, P. S., Hamouda, O., Delpech, V., Geduld, J. E., Prejean, J., Semaille, C., Kaldor, J., Folch, C., Op de Coul, E., Marcus, U., Hughes, G., Archibald, C. P., Cazein, F., McDonald, A., Casabona, J., van Sighem, A., Fenton, K. A. & Annecy MSM Epidemiology Study Group. (2009) Reemergence of the HIV epidemic among men who have sex with men in North America, Western Europe, and Australia, 1996-2005. *Annals of Epidemiology*. 19 (6). p.423-431.
- Suzuki, Y., and Craigie R. (2007) The road to chromatin-nuclear entry of retroviruses. *Nat. Rev. Microbiol*. 5. p.187-196.
- Takebe, Y., Uenishi, R. & Li, X. (2008) Global molecular epidemiology of HIV: understanding the genesis of AIDS pandemic. *Advances in Pharmacology*. 56. p.1-25.
- Tamashiro, H. & Constantine, N.T. (1994) Serological diagnosis of HIV infection using oral fluid samples. *Bulletin of The world Health Organization*. 72(1). p.135-143.
- Tan, X., Pearce-Pratt, R. & Phillips, D. M. (1993) Productive infection of a cervical epithelial cell line with human immunodeficiency virus: implications for sexual transmission. *Journal of Virology*. 67 (11). p.6447-6452.
- U.S Department of Health and Human Services (USDHHS). (2014) HIV among Gay and Bisexual Men.

- United Kingdom Health Protection Agency. (2012) *HIV in the United Kingdom: 2012 report*. London: Health Protection Agency. Disponível em: http://www.hpa.org.uk/webc/HPAwebFile/HPAweb_C/1317137200016).
- Van Doornum, G. J., Lodder, A., Buimer, M., van Ameijden, E. J. & Bruisten, S. (2001) Evaluation of hepatitis C antibody testing in saliva specimens collected by two different systems in comparison with HCV antibody and HCV RNA in serum. *Journal of Medical Virology*. 64 (1). p.13–20.
- Vanden Berghe, W., Nostlinger, C., Buvé, A., Beelaert, G., Fransen, K. & Laga, M. (2011) A venue-based HIV prevalence and behavioural study among men who have sex with men in Antwerp and Ghent, Flanders, Belgium, October 2009 to March 2010. *Euro Surveill*. 16(28). pii: 19914.
- Vermoesen, T., Beelaert, G., Menten, J., Hutse, V., Wouters, K., Platteau, T., Florence, E., & Fransen K. (2012) Using Conventional HIV tests for HIV Diagnosis on Oral Fluid Specimens. 2012 National Summit on HIV and Viral Hepatitis Diagnosis, Prevention, and Access to Care Washington DC.
- Videira e Castro, S. F. R. (2010) *Diversidade genética e resistência aos anti-retrovirais inibidores enzimáticos de vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) de uma população de toxicodependentes por via endovenosa da Grande Lisboa*. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Médica, Universidade NOVA de Lisboa.
- Vyse, A. J., Cohen, B. J. & Ramsay, M. E. (2001) A comparison of oral fluid collection devices for use in the surveillance of virus diseases in children. *Public Health*. 115 (3). p.201–207.
- Wood, L., Chahroudi, A., Chen, H., Jaspan, H. & Sodora, D. (2013) The Oral Mucosa Immune Environment and Oral Transmission of HIV/SIV. *Immunol Rev*. 254(1).
- World Health Organization. (1997) *Weekly Epidemiological Record*. 72(12). p.81-8.
- Wu, Z., Chen, Z. & Phillips, D. M. (2003) Human genital epithelial cells capture cell free human immunodeficiency virus type 1 and transmit the virus to CD4+ cells:

implications for mechanisms of sexual transmission. *Journal of Infectious Diseases*. 188 (10). p.1473–1482.

Xu, Y., Zhang, Z., Li, D., Liu, Y., Pan, S.W., Qi, X., Wang, B., Luo, F., Xiao, D., Shao, Y. & Ruan, Y. (2013) Willingness to Use the Oral Fluid HIV Rapid Test among Men Who Have Sex with Men in Beijing, China. *Plos One*. 8(5).

Zelin, J., Garrett, N., Saunders, J., Warburton, F., Anderson, J., Moir, K., Symonds, M., Estcourt, C. & North East London Sexual Health Network Research Consortium (2008) An evaluation of the performance of OraQuick ADVANCE Rapid HIV-1/2 Test in a high-risk population attending genitourinary medicine clinics in East London, UK. *International Journal of STD and AIDS*. 19 (10). p.665-667.

7. Anexos

Anexo 1: Termo de consentimento informado, livre e esclarecido

This Informed Consent Form is for men who attend different gay venues in [city], and who we are inviting to participate in a bio-behavioural European survey. The title of our research project is Sialon II - *Capacity building in combining targeted prevention with meaningful HIV surveillance among Men who have Sex with Men*.

Principal investigator: [name]

Organization: [name]

[Name of Sponsor]

[Name of Proposal and version]

PART I: Information Sheet

The association [NGO name], together with the centre [center name], is participating in a research project co-funded by the European Commission which collects behavioural and biological data among men who have sex with men (MSM) in different European countries. We ask you to participate in this research study. You are free to ask questions about possible risks and benefits, your rights as a volunteer, and about other aspects of the study which are not clear. The study is entirely anonymous. If you have questions later, please contact: [name of a person or association and telephone number]

Purpose of the research

The aim of the Sialon II project is to estimate occurrence of HIV among MSM in the data collection sites and to study sexual behaviour risk patterns and prevention needs in the MSM population. It's planned that the results of this research will help to improve prevention programs in [city or country].

Type of Research Intervention

This research will involve the collection of data on prevention needs and behaviour through an anonymous self-administered questionnaire that you will have to fill in by yourself, as well as the collection of an oral fluid sample to analyze the presence of antibodies against HIV. Collection of oral fluid is a non-invasive method that is easy,

safe, it proved to be highly acceptable in many studies and it does not require specific skills. The test result will be provided in another time and location, given that the participant contributed both to answering to the questionnaire and provided saliva sample.

Participant selection

We would like to inform you that this study is targeting persons who are 18 years old, who attend different gay venues in [*city or country*], who have had sexual relationships with another man at least once during the last 12 months and who have not already participate in the project previously.

Voluntary Participation

Your participation in this study is completely voluntary. You can withdraw from the study at any moment, without any consequences and without giving any reason. Whether you choose to participate or not, prevention material will be offered to you as part of a prevention campaign included in the project, and you will not be penalized in any way.

Procedures and Protocol

Description of the

Process

If you choose to take part in this study, the following will take place:

1. You will be requested to complete a questionnaire which includes questions about your sexual life and prevention needs. It is not an interview. You will be asked to return the survey to the study's field workers who will take steps to preserve your confidentiality. You must fill in the questionnaire alone and, if surrounded by others, data collectors will offer you a place where you can fill in the questionnaire in privacy. The data collector can then stay with you until the questionnaire is completed and handed back to be sure to respect the respondent's privacy. When you has finished filling in the questionnaire, the data collector takes it back and places it, in front of you, into the bag or box or he hold the bag or box out to you so you can put the questionnaire into it.

2. A biological sample (oral fluid) will be collected. The test tube should

immediately be passed to the field worker and be placed back in the bag or fridge box, depending on environmental temperature and send to a laboratory to analyze the presence of antibodies against HIV. The test is for research purposes and is not a rapid, diagnostic test, although the result will be given to you after a week in a voluntary counselling centre (VCT). The result will be only preliminary. Possible “reactive” results will be only considered “preliminary positive” and not diagnostic. For this reason, in any case, as this saliva test result is not diagnostic you will be offered the chance to be tested again with another test performed on blood serum.

3. Questionnaires are matched to samples using a barcode (not your name) which identifies you as study participant. When you hand back the test tube the data collector hands over the card with the barcode on it. Using this card, you can pick up your test results after a week or you can phone the number provided on the card and state that you participated in SIALON study and would like to know your test results.

How the sample is collected

The oral fluid samples will be collected using a specific device, which consists of a foam swab affixed to a plastic stick. You need to rub the swab along the gums like a toothbrush for approximately 30 times on each gum, 60 times in total (1 minute).

Accuracy of the test

Regardless of the result of this test on oral fluid, since it is not diagnostic, you will be offered to be tested again with another test performed on blood serum when you will pick up the result on your oral fluid. In case the test on blood will be positive you will be offered to follow the procedures foreseen according to the international/national guidelines. In case you do not want to be tested again on blood, you will be given the oral fluid test result and you will have to sign an informed consent form clearly stating that the result is only for epidemiological purposes, and not diagnostic.

Risks

It is possible you feel like some questions are invading your privacy. Remember the study is completely anonymous and that you are free not to answer it. Procedures to maintain anonymity will be adopted not only for the questionnaire but also for the oral fluid results disclosure and it will be done by certified counsellors with several years' experience. You are required to sign the informed consent form, but you can also use any kind of mark you like without using real name. You don't need to show any kind

of document, it is just a formality that is required to show the importance of voluntary consent. Staff could offer you a place to fill in the questionnaire in privacy. The venue has not been monitored by police, it is not at risk of being obliged to reveal identities to the authorities. When you go to pick up your test result all you need is the Card and barcode we will provide you, so the results too are anonymous.

Benefits

If you participate in this research, the benefits for men who have sex with men could be important: we plan that your participation will help us to develop adequately prevention programs for MSM in our country and to obtain data to be comparable with other European countries. At individual level, participants in the survey may benefit from knowing their HIV serostatus and being referred to care. Moreover, test for Syphilis, HBV and HCV will be offered where possible. If not, information on where to go in order to perform these additional tests using the national health care service provision system will be done. You will receive a pre-post test counselling and treatment according to local standards if it is necessary.

Reimbursements

In this project we don't give any economical incentives. Respondents will be given prevention material as a free pack containing a condom and a leaflet with information on the closest HIV screening and counselling centres, where people can obtain testing and receive information on HIV/STI prevention and treatment.

Confidentiality

Confidentiality is assured. The information collected from this research project is completely anonymous and confidential, even for data collectors. For that reason, you don't need to write your name in the informed consent form. The linkage between questionnaire, biological sample, the card for the test results and the respondent will be made by means of identical barcode tags. At the end of the data analysis phase, data will be destroyed. After the analysis of the oral samples in each national Lab, oral samples will be destroyed by the professionals. As regards the questionnaires, they will be destroyed after introducing in a central database by the statisticians. In any case, samples without written consent will be not used for testing and destroyed immediately. Samples will be used and stored until one year after the end of the SIALON II project.

Sharing the Results

The knowledge that we get from doing this research will be shared with you through a community report and the SIALON website. After this, we will publish the results in scientific conferences and journals in order to let interested professionals learn from our research. It will not be possible to identify any individual participant in any published or otherwise disclosed information

Right to Refuse or Withdraw

You do not have to take part in this research if you do not wish to do so. You may also stop participating in the research at any time you choose. It is your choice and all of your rights will still be respected. Refusing or withdrawing will not affect any of your ongoing or future medical care.

Who to Contact

If you have any questions you may ask us now or later or come to our association, even before the results are available. If you wish to ask questions later, you may contact [*name, address, telephone number*]

This proposal has been reviewed and approved by _____ which is a committee whose task it is to make sure that research participants are protected from harm. It has also been reviewed by the Ethics Review Committee of the World Health Organization (WHO), which is funding/sponsoring/supporting the study.

PART II: Certificate of Consent

The aim of the study is to estimate the number of Men who have Sex with Men (MSM) infected by HIV in the data collection sites and to study sexual behaviour risk patterns and prevention needs in the MSM population.

You will be requested to complete a questionnaire which questions about your sexual life and prevention. You will be asked to return the survey to the study's data collectors who will take steps to preserve your confidentiality according to the detailed information given above in part I of this document. A biological sample (oral fluid) will be collected by the data collector anonymously. The test tube should immediately be placed back in the bag or fridge box, depending on environmental temperature and send to a laboratory to analyze the presence of antibodies against HIV. The test is for research purposes and is not a rapid, diagnostic test, although the result can be given after a week in a voluntary counselling centre (VCT). As the test result is not diagnostic you should be tested again with another test performed on blood serum. In case the test is positive you will be offered to retest (according to the

international/national guidelines) and directed to the infectious disease department for further checks of the clinical situation and management of your conditions.

I hereby declare that I have been informed:

- of the aims of the research;
- of the fact that subjects included in this study are male individuals who have had any sex (oral and anal, penetrative or not) at least once with another man during the last 12 months;
- of the methodology of the research;
- of the possibility of withdrawing my consent to the use of my biological sample (oral fluid) and of the information contained in my replies to the questionnaire at any time, and of the fact that refusing or withdrawing will not affect any of your ongoing or future medical care;
- of the fact that no genetic analysis will be carried out on my oral fluid sample;
- of the fact that the data will be forwarded to the organisation responsible for analysis and will be processed, for the purposes established by the research project, in accordance with the current legal provisions on the protection of privacy (Law xxxxx and subsequent amendments and additions), and will be destroyed following the procedures stated under paragraph “Confidentiality” above.

Moreover I declare that I have received a separate sheet with all detailed information given in part I of this Informed Consent Form.

Having taken note of the above, I knowingly and freely agree to the use of my biological sample (saliva) and behavioural information supplied by me through the questionnaire in this study. I have had the opportunity to ask questions about it and any questions that I have asked have been answered to my satisfaction.

I consent voluntarily to participate as a participant in this research.

Signature of Participant _____ Date __

Day/month/year

Statement by the researcher/person taking consent

I have accurately read out the information sheet to the potential participant, and to the best of my ability made sure that the participant understands that the following will be done:

1.

2.

3.

I confirm that the participant was given an opportunity to ask questions about the study, and all the questions asked by the participant have been answered correctly and to the best of my ability. I confirm that the individual has not been coerced into giving consent, and the consent has been given freely and voluntarily.

A copy of this ICF has been provided to the participant.

Print Name of Researcher/person taking the consent_____

Signature of Researcher /person taking the consent_____

Date _____

Day/month/year

Anexo 2: Composição de Meios e Soluções

1. Meio LB:

10 g Bacto-triptona, 5 g extracto de levedura, 10 g NaCl, 15 g agar*.

Adicionar água para 1000 ml e autoclavar.

*não adicionar para LB líquido.

2. Meio de criopreservação:

10% (v/v) DMSO, 10% (v/v) glicerol, em meio LB líquido.

3. Solução de agarose (1%) (p/v) (100 ml):

1 g agarose, 100 ml TAE 0,5X.

4. Solução de agarose (1,2%) (p/v) (100 ml):

1,2 g agarose, 100 ml TAE 0,5X.

5. Solução de agarose (1,5%) (p/v) (50 ml):

0,75 g agarose, 50 ml TAE 0,5X.

6. Tampão Tris-acetato-EDTA (TAE) 50X:

242 g Tris-base, 57,1 ml ácido acético glacial, 100 ml 0,5M EDTA, pH 8,0.

Adicionar água para 1000 ml.

7. Tampão de aplicação:

0,25% (p/v) azul de bromofenol, 40% (p/v) sacarose.

8. Tampão da T4 DNA ligase 2X (Promega, EUA):

60 mM Tris-HCl, pH 7,8, 20 mM MgCl₂, 20 mM DTT, 2 mM ATP, 10% (v/v) PEG.

9. Tampão de recuperação:

10% (v/v) soro fetal bovino, 0,2% (v/v) Tween 20, 0,5% (p/v) gentamicina, em tampão PBS (pH 7,2).

10. Meio de transformação e armazenamento (TSS):

LB 1X, 10% (v/v) PEG6000, 5% (v/v) DMSO, 50 mM MgSO₄ (pH 6,5).

11. Placas LB agar/X-Gal/IPTG/ampicilina:

LB sólido [Bacto-agar a 1,5% (p/v) em LB líquido], 100 µg/ml ampicilina, 40 µg/ml X-Gal, 0,17 mM IPTG.

12. Tampão Tris-EDTA-glicose (TEG):

25 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 1% (p/v) glicose.

13. Solução de lise (SDS alcalino):

0,2 M NaOH, 1,5% (p/v) SDS.

14. Tampão TE:

10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA.

15. Tampão da EcoRI 10X (Fermentas, Canadá):

50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, 0,02% (v/v) Triton X-100, 0,1 mg/ml BSA.

Anexo 3: Protocolo *Genscreen™ HIV-1/2* (Bio-Rad, França)

1 - INTERESSE CLÍNICO

O síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) é uma doença infecciosa de origem viral que se traduz num défice profundo de imunidade celular.

Dois tipos de vírus relacionados com o grupo dos lentivírus foram isolados de linfócitos de doentes atingidos com SIDA ou dos seus pródromos.

O primeiro, denominado HIV-1, foi isolado em França e depois nos Estados Unidos.

O segundo, denominado HIV-2, foi isolado em dois doentes de origem africana e revelou ser responsável por um novo foco de SIDA na África Ocidental.

Os conhecimentos de que dispomos acerca da variabilidade genética das estirpes de vírus HIV foram adquiridos por análise sequencial dos genes gag, pol e env das estirpes representativas de cada um dos subtipos. Os vírus HIV-1 dividem-se em 2 grupos: o grupo M, compreendendo 9 subtipos (A a I) e o grupo O. O vírus HIV-2 compreendendo 5 subtipos.

A distribuição geográfica dos diferentes subtipos está actualmente bem definida. Certas variantes de HIV-1 têm apenas 70% de homologia para os genes gag e pol com os principais isolados e apenas 50% para o gene env; estas diferenças podem explicar o insucesso no diagnóstico da infecção em certos doentes.

As diferentes estirpes do vírus HIV-2 apresentam afinidades antigénicas com o vírus dos símios SIV ao nível de todas as proteínas (proteínas de revestimento e proteínas internas: heterologia = 30%), mas apresentam menos de 40% de homologia com as proteínas de revestimento do vírus HIV-1.

O teste *Genscreen™ HIV-1/2 Version 2* permite a detecção simultânea de anticorpos anti HIV-1 e anti HIV-2.

2 - PRINCÍPIO DO DISPOSITIVO *Genscreen™ HIV-1/2 Version 2*

Genscreen™ HIV-1/2 Version 2 é uma técnica imunoenzimática baseada no princípio de sandwich para detecção dos diferentes anticorpos associados aos vírus HIV-1 e/ou HIV-2, no soro ou plasma humano.

Genscreen™ HIV-1/2 Version 2 assenta na utilização de uma fase sólida, preparada com antígenos purificados (proteínas recombinantes gp160 e p25 do vírus HIV-1 e o péptido que reproduz o péptido imunodominante da glicoproteína de revestimento do vírus HIV-2) e de um conjugado preparado com antígenos marcados com peroxidase (proteína recombinante núcleo-capsídica e péptidos que reproduzem os epitopos imunodominantes das glicoproteínas de revestimento dos vírus HIV-1 e HIV-2).

1. Os soros a estudar, bem como os soros de controlo, são distribuídos pelos poços. Se estiverem presentes anticorpos anti HIV-1 e/ou HIV-2, estes ligam-se aos antígenos fixados na fase sólida.

O depósito da amostra é validado através de uma alteração de cor, de violeta a azul (SDP = Sample Deposition Proof).

2. Os antígenos HIV-1 e HIV-2 purificados, marcados com peroxidase, são adicionados após lavagem e ligam-se, por sua vez, às IgG e/ou IgM e/ou IgA, captadas pela fase sólida.

3. A presença da enzima imobilizada nos complexos é revelada por incubação em presença do substrato, após eliminação da fracção de conjugado deixado livre.

4. Após paragem da reacção, procede-se à leitura por espectrofotometria a 450/620-700 nm.

A absorbância observada para uma amostra permite concluir quanto à presença ou ausência de anticorpos anti HIV-1 e/ou HIV-2.

3 - COMPOSIÇÃO DO DISPOSITIVO Genscreen™ HIV-1/2 Version 2

Todos os reagentes são exclusivamente destinados a utilização no diagnóstico *in-vitro*.

Identificação no rótulo		Descrição	Apresentação/Preparação	
			72278	72279
R1	Microplate	Microplaca 12 tiras de 8 poços sensibilizados com os antígenos HIV-1 e HIV-2 purificados	1 placa	5 placas
R2	Concentrated washing solution (20X)	Solução de lavagem concentrada (20X) Tampão Tris NaCl, pH 7,4 Conservante : ProClin™ 300 (0,04%)	1 frasco 70 ml	1 frasco 235 ml
R3	Negative control	Controlo negativo Plasma humano inativado por aquecimento, negativo em antígenos HBs e HIV e em anticorpos anti HIV-1, anti HIV-2 e anti VHC Conservante : Azida de Sódio < 0,1%	1 frasco 1 ml	1 frasco 1 ml
R4	Cut-off control	Controlo cut-off Plasma humano inativado por aquecimento, positivo para anticorpos anti-HIV, negativo para antígenos HBs e para anticorpos anti-VHC. Conservante : Azida de Sódio < 0,1%	1 frasco 2,5 ml	1 frasco 2,5 ml
R5	Positive control	Controlo positivo Plasma humano inativado por aquecimento, positivo para anticorpos anti-HIV, negativo para antígenos HBs e para anticorpos anti-VHC. Conservante : Azida de Sódio < 0,1%	1 frasco 1 ml	1 frasco 1 ml
R6	Sample diluent	Dilúente das amostras Solução de soro de vitela (tampão TRIS adicionado de 0,1% de clorofórmio, de ProClin™ 300 e de um Indicador com cor, testemunho de depósito das amostras)	1 frasco 14 ml	2 frascos 2 x 10 ml
R7a	Conjugate	Conjugado Antígenos HIV-1 e HIV-2 purificados, marcados com peroxidase, liofilizados	1 frasco q.s. ad 12,5 ml	2 frascos q.s. ad 2 x 30 ml
R7b	Conjugate diluent	Dilúente do conjugado Solução de leite desnatado corado (tampão TRIS adicionado de 0,1% de clorofórmio e ProClin™ 300)	1 frasco 12,5 ml	2 frascos 2 x 30 ml
R8	Substrate buffer	Tampão para substrato da peroxidase Solução de Citrato de Sódio e de Acetato de Sódio pH 4,0, contendo 0,015% de H ₂ O ₂ e 4% de DMSO	1 frasco 60 ml	2 frascos 2 x 60 ml
R9	Chromogen: TMB solution (11X)	Cromogénio Solução contendo tetrametil benzidina (TMB)	1 frasco 5 ml	2 frascos 2 x 5 ml
R10	Stopping solution	Solução de paragem Ácido sulfúrico 1N	1 frasco 28 ml	3 frascos 3 x 28 ml

4 - VALIDADE – CONSERVAÇÃO

O dispositivo deve ser conservado entre +2-8°C. Cada elemento constituinte do dispositivo Genscreen™ HIV-1/2 Version 2 conservado a +2-8°C pode ser utilizado até à data de validade indicada na embalagem, salvo indicação específica :

R1 : Uma vez aberta a bolsa selada sob vácuo, as tiras de micro-poços conservadas a +2-8 °C na bolsa cuidadosamente selada de novo podem ser utilizadas durante 1 mês.

R2 : A solução de lavagem diluída pode ser armazenada à temperatura ambiente (2-30°C) durante 2 semanas. A solução de lavagem concentrada (R2) pode ser armazenada à temperatura de +2-30°C.

R7a + R7b : Os reagentes armazenados à temperatura de +2-8°C podem ser utilizados durante 4 semanas após a reconstituição dos frascos.

R8 + R9 : Após a reconstituição, o reagente armazenado em local escuro pode ser utilizado durante 6 horas à temperatura ambiente (18-30°C).

5 - MATERIAL NECESSÁRIO MAS NÃO FORNECIDO

- Água destilada.
- Hipocloreto de sódio (lixívia) e bicarbonato de sódio.
- Pipetas, multipipetas automáticas ou semi-automáticas, reguláveis ou fixas, para medir e fornecer 25 µl, 50 µl, 75 µl, 80 µl e 100 µl.
- Provetas graduadas de 25 ml; 100 ml; 1000 ml.
- Contentor de resíduos contaminados.
- Recipiente de banho-maria ou incubadora de microplacas com termóstato a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ (*).
- Dispositivo de lavagem manual, semi-automático ou aparelho de lavagem para placa de micro-titulação (*).
- Aparelho de leitura para microplacas, equipado com filtros de 450 nm e 620-700 nm (*).
- Papel absorvente.

(*) Para uma informação mais precisa sobre os aparelhos validados pelos nossos serviços técnicos é favor contactar-nos.

6 - AMOSTRAS

Recolher uma amostra de sangue segundo a prática habitual.

Os testes são efectuados em amostras não diluídas de soro ou de plasma (recolhidos com anti-coagulantes como EDTA, heparina, citrato ou ACD)

Separar o plasma ou o soro do coágulo ou dos glóbulos vermelhos logo que possível para evitar qualquer hemólise. Uma hemólise muito pronunciada pode afectar o desempenho do teste. As amostras que apresentem agregados devem ser clarificadas por centrifugação, antes da realização do teste. As partículas ou agregados de fibrina em suspensão podem dar resultados falsamente positivos.

Não aquecer as amostras.

As amostras devem ser conservadas a $+2-8^{\circ}\text{C}$ se a detecção for efectuada no prazo de 7 dias ou podem ser conservadas congeladas a -20°C . Os plasmas deverão sofrer uma descongelação rápida por aquecimento durante alguns minutos, a 40°C (para limitar a precipitação de fibrina).

Evitar processos de congelação/descongelação repetidos.

Não devem ser utilizadas amostras que tenham sido congeladas e descongeladas mais de 3 vezes.

Se for necessário transportar as amostras, estas deverão ser acondicionadas segundo a regulamentação em vigor relativa ao transporte de agentes etiológicos.

NÃO UTILIZAR SOROS OU PLASMAS CONTAMINADOS, HIPERLIPÉMICOS OU HIPER-HEMOLISADOS.

Observação: Não foi demonstrada qualquer interferência em amostras contendo até 90 g/l de albumina, e 200 mg/l de bilirrubina, bem como em amostras lipémicas contendo até 36 g/l de triglicéridos e em amostras hemolisadas contendo até 20 g/l de hemoglobina.

7 - PRECAUÇÕES

A qualidade dos resultados depende da correcta implementação das seguintes boas práticas de laboratório :

- O nome do teste, bem como um número de identificação específico do teste, estão referidos no quadro de cada microplaca. Este número de identificação específico figura igualmente em cada tira.

Genscreen[®] HIV 1/2 Version 2 : Número específico de identificação = 05

Esta identificação deve ser verificada antes de cada utilização. Qualquer tira cujo número de teste não esteja presente ou seja diferente do acima referido não deverá ser utilizada.

- Não utilizar reagentes após a respectiva data de validade.
- Não misturar reagentes de lotes diferentes no decorrer de um mesmo ensaio.

NOTA : É possível utilizar outros lotes de solução de lavagem (R2, identificação do rótulo: cor verde 20X), de tampão substrato (R8, identificado como TMB buf. a azul), de cromogénio (R9, identificado como TMB 11X, a roxo) e de solução de paragem (R10, identificado como 1N a vermelho), para além dos fornecidos no dispositivo, desde que se utilize apenas um único destes lotes no decorrer de um mesmo ensaio. Estes reagentes podem ser utilizados com outros produtos da nossa empresa. Para além disso, a solução de lavagem (R2, identificação do rótulo: **cor verde 20X**) pode ser misturada com as outras 2 soluções de lavagem incluídas nos kits de reagentes Bio-Rad (R2, identificações dos rótulos : cor azul 10X ou cor laranja 10X) quando adequadamente reconstituídas, desde que apenas uma mistura seja utilizada num determinado ensaio. Para obter informações detalhadas é favor consultar os nossos serviços técnicos.

- A solução de revelação (tampão substrato + cromogénio) deve ser de cor rosa. O aparecimento de qualquer outra coloração nos minutos que se seguem à reconstituição indica que o reagente não pode ser utilizado e deve ser substituído.

Para esta preparação utilizar, de preferência, recipientes e material de distribuição em plástico descartável ou recipientes em vidro previamente lavados com ácido clorídrico 1N, enxaguados com água destilada e devidamente limpos. Conservar esta solução ao abrigo da luz.

- Antes da utilização é necessário aguardar 10 minutos para que os reagentes estabilizem à temperatura ambiente.
- Reconstituir cuidadosamente os reagentes.

- Verificar a exactidão e a precisão das pipetas, bem como o bom funcionamento dos aparelhos utilizados.
- Não alterar o modo de procedimento.
- Lavagem: é indispensável respeitar escrupulosamente os procedimentos de lavagem, a fim de se obter o maior rendimento do teste.

Conselhos de higiene e segurança

Os controlos positivo e cut-off foram inactivados por calor.

O material de origem humana utilizado na preparação do controlo negativo foi testado e comprovado como negativo para anticorpos anti HIV-1 e HIV-2, antígenos HBs e anticorpos anti-HCV.

O material de origem humana utilizado na preparação do controlo positivo e do soro cut-off foi testado e comprovado como negativo para antígenos HBs e anticorpos anti-HCV.

Pelo facto de nenhum método poder garantir, de forma absoluta, a ausência de vírus HIV, Hepatites B ou C ou outros agentes infecciosos, estes reagentes, bem como as amostras dos doentes, devem ser considerados como potencialmente infecciosos e, como tal, manipulados com as precauções habituais.

Considerar o material directamente em contacto com as amostras e os reagentes, bem como as soluções de lavagem, como produtos contaminados.

A esterilização em autoclave a 121°C, durante um mínimo de uma hora, constitui o melhor processo de inactivação dos vírus HIV e do vírus da hepatite B.

NÃO INTRODUIR NA AUTOCLAVE SOLUÇÕES CONTENDO HIPOCLORETO DE SÓDIO.

A ficha de dados de segurança está disponível a pedido.

O tratamento de soluções e de materiais contaminados por meio de lixívia à concentração final de hipocloreto de sódio a 5% durante 30 minutos permite igualmente a inactivação dos vírus HIV e do vírus da hepatite B.

Evitar qualquer contacto do tampão substracto, do cromogénio e da solução de paragem com a pele e as mucosas (risco de toxicidade, irritação e queimadura).

Por outro lado, a manipulação e a eliminação dos produtos químicos deve ser efectuada segundo as boas práticas de laboratório.

Para obter recomendações relativas a perigos e precauções relacionadas com alguns componentes químicos neste kit de teste, consulte as ilustrações indicadas nos rótulos e as informações fornecidas no final das instruções de utilização. A Ficha de Dados de Segurança encontra-se disponível em www.bio-rad.com.

8 - RECONSTITUIÇÃO DOS REAGENTES

Nota : Antes de utilizar, aguardar até que todos os reagentes atinjam a temperatura ambiente (18 a 30°C).

Reagente 1 (R1): Microplaca

Cada suporte quadro que contém 12 tiras está acondicionado numa bolsa de alumínio selada. Corte a bolsa com a ajuda de tesouras ou escalpelo de 0,5 a 1 cm acima da soldadura. Abra a bolsa e retire o quadro. Coloque as tiras não-utilizadas de volta na bolsa. Feche cuidadosamente a bolsa e guarde-a de novo a +2-8 °C.

Reagente 2 (R2): Solução de lavagem concentrada (20X)

Diluir 20 vezes a solução em água destilada. Obtém-se assim a solução de lavagem pronta a utilizar. Prever 800 ml para uma placa de 12 tiras.

Reagente 3 (R3): Controlo negativo

Soro humano negativo para anticorpos anti HIV-1 e anti HIV-2, para antígeno HBs e para anticorpos anti-HCV, contendo 0,1% de azida de sódio.

Reagente 4 (R4): Controlo cut-off

Soro humano contendo uma reduzida quantidade de anticorpos anti-HIV negativos para antígeno HBs e anticorpos anti-HCV, inactivado pelo calor, contendo 0,1% de azida de sódio.

Reagente 5 (R5): Controlo positivo

Soro humano positivo para anticorpos anti-HIV, negativo para antígeno HBs e anticorpos anti-HCV, inactivado pelo calor, contendo 0,1% de azida de sódio.

Reagente 6 (R6): Diluente das amostras

Solução de soro de vitela (tampão TRIS adicionado de 0,1% de clorofórmio, de ProClin™ 300 e de um indicador com cor, testemunho de depósito das amostras).

Reagente 7a (R7a): Conjugado

Antígenos HIV-1 e HIV-2 purificados, marcados com peroxidase.

Contém BSA e ProClin™ 300 (0,1%).

Bater suavemente o frasco sobre a bancada para destacar qualquer substância que possa ter aderido à rolha de borracha. Retirar a rolha com cuidado e deitar o conteúdo de um frasco de diluente conjugado num frasco de conjugado liofilizado. Voltar a tapar o frasco e deixar repousar durante 10 minutos, agitando e invertendo periodicamente, para facilitar a dissolução.

Reagente 7b (R7b): Diluente do conjugado

Solução de leite desnatado corado (tampão TRIS adicionado de 0,1% de clorofórmio e ProClin™ 300).

Reagente 8 (R8): Tampão para substrato da peroxidase

Solução pronta a utilizar de ácido cítrico e acetato de sódio pH 4,0 contendo 0,015% de água oxigenada e 4% de dimetilsulfoxida (DMSO).

Reagente 9 (R9): Cromogénio

Solução contendo tetrametilbenzidina (TMB). Diluir 11 vezes a solução no tampão substrato (ex. : 1 ml de reagente R9 +10 ml de reagente R8). Estabilidade 6 horas.

Reagente 10 (R10) : Solução de paragem

Solução de ácido sulfúrico 1N pronta a utilizar

9 - MODO DE FUNCIONAMENTO

Seguir estritamente o protocolo proposto.

Utilizar os soros de controlo negativo, positivo e o de cut-off em cada realização do teste, para validar a qualidade do teste.

Aplicar as boas práticas de laboratório :

1. Estabelecer cuidadosamente o plano de distribuição e de identificação das amostras
2. Preparar a solução de lavagem diluída,
3. Retirar o tabuleiro e as tiras (R1) da embalagem de protecção
4. Depositar directamente, sem pré-lavagem da placa, e em sucessão :

25 µl de diluente em cada poço

75 µl de soro de controlo negativo (R3) em A1

75 µl de soro de controlo cut-off (R4) em B1, C1 e D1

75 µl de soro de controlo positivo (R5) em E1

75 µl da primeira amostra em F1,

75 µl da segunda amostra em G1, etc..

Em função do sistema utilizado é possível modificar a posição ou a ordem de distribuição dos controlos.

Homogeneizar a mistura num mínimo de 3 aspirações, com a pipeta de 75 µl ou agitando a microplaca após a etapa de pipetagem.

É igualmente possível depositar 100 µl de uma amostra previamente diluída a 3/4 (ex. 150 µl de soro + 50 µl de diluente).

NOTA : A distribuição das amostras pode ser controlada visualmente nesta fase de manipulação; com efeito, após adição das amostras, o diluente, inicialmente de cor violeta, passa a azul. (ver o capítulo 12 para a verificação automática - VERIFICAÇÃO ESPECTRO-FOTOMÉTRICA DO DEPÓSITO DAS AMOSTRAS E DO CONJUGADO).

5. Sempre que possível, cobrir com fita adesiva, pressionando bem sobre toda a superfície, para assegurar o total isolamento.
6. Incubar a microplaca em banho-maria equipado com termóstato ou numa incubadora a seco de microplacas, durante 30 ± 5 minutos a $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$.
7. Retirar a fita adesiva. Aspirar o conteúdo de todos os poços para um contentor de resíduos contaminados (contendo hipoclorito de sódio) e adicionar imediatamente em cada uma delas um mínimo de 370 µl de solução de lavagem. Respeitar um tempo de imersão (tempo de espera) mínimo de 30 segundos. Aspirar de novo. Repetir a lavagem pelo menos duas vezes (ou seja, um mínimo de 3 lavagens, no total). O volume residual deve ser inferior a 10 µl (se necessário, secar a placa por inversão, sobre uma folha de papel absorvente). (ver 10 : Observações).

8. Se se utilizar um lavador automático, respeitar o mesmo ciclo operativo (ver capítulo Distribuir rapidamente 100 µl da solução de conjugado em todos os poços. O conjugado deve ser agitado antes da utilização.

NOTA : A distribuição do conjugado, que é de coloração verde, pode ser visualmente controlada nesta fase da manipulação, (ver capítulo 12 para a verificação automática - VERIFICAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DO DEPÓSITO DAS AMOSTRAS E DO CONJUGADO).

9. Sempre que possível, cobrir com nova fita adesiva e incubar 30 ± 5 minutos à temperatura ambiente ($18-30^{\circ}\text{C}$).
10. Retirar a fita adesiva, esvaziar todos os poços por aspiração e lavar pelo menos 5 vezes, como atrás descrito. O volume residual deve ser inferior a 10 µl (se necessário, secar as tiras por inversão sobre uma folha de papel absorvente).

11. Distribuir rapidamente por todos os poços 80 µl da solução de revelação da actividade enzimática (R8 + R9), anteriormente preparada. Deixar que a reacção se desenvolva no escuro durante 30 ± 5 minutos à temperatura ambiente (18 a 30°C). Nesta incubação não utilizar película adesiva.

NOTA : A distribuição da solução de revelação, de cor rosa, pode ser controlada visualmente nesta fase da manipulação: observa-se uma diferença de coloração significativa entre um poço vazio e um poço contendo a solução de revelação rosa (consultar o parágrafo 12 para a verificação automática, VERIFICAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DO DEPÓSITO DAS AMOSTRAS E DOS REAGENTES).

12. Adicionar 100 µl da solução de paragem (R10), adoptando a mesma sequência e o mesmo ritmo de distribuição que para a solução de revelação. Homogeneizar a mistura reaccional.
NOTA : A distribuição da solução de paragem, que é incolor, pode ser controlada visualmente nesta fase da manipulação. A coloração do substrato, rosa (para as amostras negativas) ou azul (para as amostras positivas) desaparece dos poços, que assim se tornam incolores (para as amostras negativas), ou amarelos (para as amostras positivas), após adição da solução de paragem.
13. Secar cuidadosamente a superfície inferior das placas. **Pelo menos 4 minutos após a distribuição da solução de paragem** e nos 30 minutos que se seguem à paragem da reacção, proceder à leitura da densidade óptica a 450/620-700 nm por meio de um leitor de placas.
14. Antes de se efectuar a transcrição dos resultados, assegurar a concordância entre a leitura e o plano de distribuição e de identificação das placas e das amostras.

10 - OBSERVAÇÕES

ATENÇÃO : EVITAR AS CONTAMINAÇÕES DURANTE A MANIPULAÇÃO EM CASO DE CONTAMINAÇÃO (derramamentos, etc.)

- Os derramamentos de substâncias não ácidas devem ser completamente limpos por meio de uma solução a 5% (mínimo) de hipocloreto de sódio (lixívia).
- Os derramamentos de substâncias ácidas devem ser limpos a seco. A zona derramada deve, em seguida, ser limpa por meio de uma solução a 5% (mínimo) de hipocloreto de sódio. O material utilizado para a limpeza deverá ser deitado fora num contentor especialmente destinado a resíduos contaminados e depois eliminado segundo as regras adequadas ao efeito (ver precauções, § 7).
- NUNCA UTILIZAR A MESMA PIPETA PARA DISTRIBUIR O CONJUGADO E A SOLUÇÃO DE REVELAÇÃO.
- RESPEITAR O NÚMERO DE CICLOS DE LAVAGEM PRESCRITOS.*
- CONTROLAR A SOLUÇÃO DE REVELAÇÃO ENZIMÁTICA (tampão substrato cromogénio) ANTES DA DISTRIBUIÇÃO.

Esta deve ser incolor.

O aparecimento de uma coloração azul nos minutos que se seguem à reconstituição indica que o reagente não pode ser utilizado e deve ser substituído.

Com efeito, o tampão substrato, o cromogénio, a solução de revelação e a solução de paragem podem ser contaminados por iões metálicos.

Por esta razão, utilizar preferencialmente recipientes e material de distribuição em plástico descartável ou em vidro previamente lavado com ácido clorídrico 1N, enxaguado em água destilada e seco.

(*) Para informações mais específicas acerca dos aparelhos validados é favor consultar os nossos serviços técnicos.

11 - CÁLCULO E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

A presença ou a ausência de anticorpos anti HIV-1 e/ou HIV-2 é determinada por comparação, para cada amostra, da absorvância registada com a do valor de cut-off calculado.

1) Calcular a média das absorvâncias para o soro de controlo de cut-off ($\overline{DOR4}$)

$$\overline{DOR4} = \frac{DO (B1) + DO (C1) + DO (D1)}{3}$$

2) Cálculo do valor de cut-off

O valor de cut-off será determinado pela relação :

$$CO = \frac{\overline{DOR4}}{10}$$

3) Valor do teste

O soro de controlo negativo deve ser inferior a 70% do valor de cut-off :

$$DOR3 < 0,7 \text{ CO}$$

A média dos soros de controlo de cut-off deve ser superior a 0,80 :

$$\overline{DOR4} > 0,8$$

Facultativo: a relação: $DOR5/\overline{DOR4}$ deve ser superior ou igual a 1,3 (Esta norma opcional é aplicável apenas quando a linearidade do leitor utilizado é superior a 3,000).

4) Interpretação dos resultados

As amostras cujas absorvâncias sejam inferiores ao valor de cut-off são consideradas negativas, segundo o teste Genscreen™ HIV-1/2 Version 2.

No entanto, os resultados situados imediatamente abaixo do valor de cut-off ($CO - 10\% < DO < CO$) devem ser interpretados com prudência, sendo aconselhável testar de novo as amostras em duplicado, quando os sistemas utilizados e os procedimentos de laboratório o permitirem).

As amostras cujas absorvâncias sejam iguais ou superiores ao valor de cut-off são consideradas inicialmente positivas, segundo o teste Genscreen™ HIV-1/2 Version 2. Devem ser controladas de novo em duplicado, antes da interpretação final.

Se, após a repetição do teste, para uma amostra, a absorvância dos dois duplicados for inferior ao valor de cut-off, o resultado inicial é não reprodutível e a amostra é declarada negativa, segundo o teste Genscreen™ HIV-1/2 Version 2.

A origem das reacções não reprodutíveis está, frequentemente, relacionada com as seguintes causas :

- lavagem insuficiente das microplacas,
- contaminação das amostras negativas por um soro ou um plasma contendo um título elevado de anticorpos,
- contaminação pontual da solução de revelação por agentes químicos oxidantes (lixívia, iões metálicos, etc.).
- contaminação pontual da solução de paragem.

Se, após a repetição do teste, a absorvância medida em um dos dois duplicados for igual ou superior ao valor de cut-off, o resultado inicial é reprodutível e a amostra é declarada positiva, segundo o teste Genscreen™ HIV-1/2 Version 2 e tratada como indicado no § 13.

12 - VERIFICAÇÃO ESPECTROFOTOMÉTRICA DA DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS E DO CONJUGADO

Verificação da distribuição das amostras

Após a distribuição sucessiva do diluente das amostras (R6) seguido das amostras, é possível verificar a presença das amostras a testar nos poços, através de leitura espectrofotométrica a 620 nm: a densidade óptica de um poço contendo uma amostra deverá ser superior a 0,150 (uma DO inferior indica uma distribuição deficiente deste).

Verificação da presença de conjugado nos poços

Após a etapa de distribuição do conjugado (R7a + R7b), é possível verificar a sua presença nos poços, por meio de leitura espectrofotométrica a 620 nm: a densidade óptica de um poço contendo conjugado deverá ser superior a 0,100 (uma DO inferior indica uma distribuição deficiente do conjugado nesse poço).

Verificação do depósito da solução de revelação

É possível verificar a presença da solução de revelação rosa por leitura automática a 490 nm : um poço contendo a solução de revelação deve apresentar uma densidade óptica superior a 0,100 (uma DO mais fraca indica uma distribuição incorrecta da solução de revelação)

Observa-se uma diferença de coloração significativa entre um poço vazio e um poço contendo a solução de revelação rosa.

13 - DESEMPENHOS

Os estudos de sensibilidade do teste Genscreen™ HIV-1/2 Version 2 foram realizados em amostras positivas de doentes atingidos com SIDA ou pré-SIDA (ARC), bem como em painéis de sensibilidade constituídos por amostras documentadas provenientes de doentes recentemente infectados pelo vírus HIV :

- a sensibilidade HIV 1 avaliada em 413 amostras de doentes com SIDA ou pré-SIDA (ARC), positivos HIV-1 grupo M e confirmados por Western Blot, bem como 31 amostras HIV-1 grupo O e confirmadas por Western Blot HIV 1, foi estimada em 100%.
- a sensibilidade grupo O, igualmente testada em 4 amostras HIV-1 grupo O indeterminadas por Western Blot, foi considerada satisfatória com 3 amostras comprovadas como positivas.
- a sensibilidade HIV-2 avaliada em 119 soros diluídos ou não diluídos e provenientes de doentes confirmados positivos por Western-Blot foi calculada em 100%.
- A sensibilidade HIV-1 grupo M foi avaliada em 29 painéis de seroconversão comerciais (BBI, NABI, Bioclinical partners), bem como no painel de sensibilidade do INTS. Os resultados estão conformes com os valores habituais. No painel do INTS, as 45 amostras de seroconversões, bem como as 13 de per-seroconversão são positivas.

A especificidade do teste nos dadores de sangue foi calculada em 99,98%, nas 5025 amostras testadas.

3 reacções positivas foram observadas na análise de 212 doentes apresentando patologias ou estados não relacionados com o vírus da SIDA (mulheres grávidas, factor reumatóide, Ig anti-nuclear ou outras infecções virais).

A precisão do teste Genscreen™ HIV-1/2 Version 2 foi determinada por análise de 4 amostras: 1 soro negativo (amostra 1), 2 soros fracamente positivos em anticorpos anti-HIV 1 (amostras 2 e 3) e 1 soro fortemente positivo em anticorpos anti HIV-1 (amostra 4). A capacidade de repetição (intra-ensaio) da técnica foi avaliada por análise destas 4 amostras, que foram testadas 30 vezes durante a mesma manipulação, enquanto que a reprodutibilidade (inter-ensaio) foi avaliada por análise destas mesmas 4 amostras que foram testadas em triplicado, em 5 dias diferentes, à razão de 2 testes independentes por dia. Os resultados estão agrupados nos 2 quadros seguintes :

Quadro 1 : Capacidade de repetição (intra-ensaio)

n = 30	amostras 1	amostras 2	amostras 3	amostras 4
média de ratios*	0,12	3,34	9,05	19,6
desvio padrão	0,04	0,45	0,30	0,73
CV (%) ratios*	31,5%	13,6%	3,3%	3,7%

* Rácios = DO/CO

Quadro 2 : Reprodutibilidade (inter-ensaio)

n = 30	amostras 1	amostras 2	amostras 3	amostras 4
média de ratios*	0,12	3,43	9,27	19,35
desvio padrão	0,02	0,41	0,89	1,93
CV (%) ratios*	19,3%	12,1%	9,65%	10,0%

* Rácios = DO/CO

14 - LIMITAÇÕES DO TESTE

Concentrações muito reduzidas de anticorpos podem não ser detectadas numa infecção recente; em consequência, um resultados negativo significa que a amostra controlada não contém anticorpos detectáveis pelo teste Genscreen™ HIV-1/2 Version 2. Um tal resultado negativo não exclui a possibilidade de uma infecção HIV-1/HIV-2.

A variabilidade dos vírus HIV-1 (grupo M, grupo O) e HIV-2 não permite excluir a possibilidade de reacções falsamente negativas. Nenhum método conhecido pode oferecer a garantia de ausência do vírus HIV.

Qualquer técnica ELISA altamente sensível pode produzir reacções falsamente positivas. A fim de verificar a especificidade da reacção, todas as amostras comprovadas como positivas e reprodutíveis (segundo os critérios de interpretação do teste Genscreen™ HIV-1/2 Version 2) devem ser submetidas a um teste de confirmação (Western-Blot).

O aquecimento das amostras pode afectar a qualidade dos resultados.

O método colorimétrico de verificação do depósito das amostras e/ou dos conjugados e/ou da solução de revelação não permite verificar a exactidão dos volumes distribuídos, mas apenas demonstrar a presença de amostras e/ou de conjugados e/ou da solução de revelação. A taxa de respostas erróneas obtidas com este método está associada à precisão do sistema utilizado (CV acumulados de pipetagem e de leitura superiores a 10% podem degradar significativamente a qualidade desta verificação).

No caso de uma lavagem incorrecta após a etapa de incubação do conjugado, a verificação automática da distribuição da solução de revelação (por leitura a 490 nm das densidades ópticas dos poços) pode dar origem a resultados erróneos, com densidades ópticas superiores a 0.100 na ausência de solução de revelação. No entanto, este fenómeno não foi observado durante as avaliações conduzidas nas 939 amostras testadas.

Anexo 4: Protocolo *Vironostika*® HIV Ag/Ab (bioMérieux, França)

1 Especificações do produto

Fabricado por:

bioMérieux SA
69280 - Marcy-l'Etoile / France
RCS LYON 673 620 399

Utilização:

Dispositivo médico para diagnóstico *in vitro*. O *Vironostika*® HIV Ag/Ab é um teste imunoenzimático (ELISA - enzyme-linked immunosorbent assay) para a detecção dos anticorpos para o vírus de imunodeficiência humana (anti-VIH-1, anti-VIH-2 e anti-VIH-1 grupo O) e antígeno VIH-1 (antígeno VIH-1 p24) em soro ou plasma humano e está indicado para o rastreio de sangue e avaliar o estatuto desconhecido relacionado com uma infecção por VIH-1 e/ou VIH-2.

A utilizar por:

Este produto deve ser utilizado por profissionais qualificados (dentro da área laboratorial), tal como definido pela legislação local.

Prazo de validade:

Utilizar antes do final do mês indicado. Consultar as etiquetas para verificar a data de validade dos componentes individuais da embalagem (data = AAAA-MM).

Armazenamento:

Armazenar entre +2 e +8 °C.

Precauções especiais:

Este dispositivo contém substâncias de origem humana e animal. Todos estes materiais devem ser manipulados com precaução e tratados como produtos potencialmente infecciosos.

2 Introdução

Os vírus de imunodeficiência humana tipo 1 e 2 são agentes etiológicos do síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA) e doenças relacionadas. O VIH tem sido isolado de pacientes com SIDA, complexo relacionado com a SIDA (CRS) e de numerosos portadores assintomáticos. A infecção pelo vírus VIH é seguida de uma doença aguda que tem as mesmas características que a gripe. Esta fase pode passar despercebida e a relação com a infecção pelo vírus VIH pode não ser clara em muitos casos. A fase aguda é tipicamente seguida por um estado de portador assintomático, que em cerca de 50 % dos indivíduos infectados, progride para o estado clínico de SIDA cerca de 10 anos a seguir à seroconversão.⁽¹⁾

Podem ser obtidas evidências serológicas da infecção pelo VIH através de testes nos quais é pesquisada a presença de antígenos ou de anticorpos VIH no soro ou plasma de indivíduos com suspeita de infecção pelo VIH. Geralmente, os antígenos só podem ser detectados durante a fase aguda e durante a fase assintomática da SIDA. Os anticorpos contra o VIH-1 e/ou VIH-2 podem ser detectados virtualmente durante todo o período da infecção, a partir da fase aguda ou imediatamente a seguir até à fase terminal da doença. A utilização de testes de elevada sensibilidade para a pesquisa de anticorpos é uma abordagem bem estabelecida para o serodiagnóstico da infecção por VIH e para a triagem de sangue ou derivados de sangue.

O desenvolvimento de testes cada vez mais sensíveis para a detecção de anticorpos, reduziu a fase de "janela", ou seja, o período de tempo que medeia entre a infecção e a detecção de anticorpos anti-VIH. Desta forma, a incorporação da detecção de antígeno VIH nos testes de elevada sensibilidade para a detecção de anticorpos anti-VIH permite reduzir ainda mais a fase da janela.

3 Princípio do teste

O *Vironostika*® HIV Ag/Ab é um teste ELISA baseado no princípio de "sandwich" numa etapa. Uma mistura de antígenos VIH e anticorpos anti-VIH marcados com peroxidase de rábano (HRP) sorvem de conjugado com tetrametilbenzidina e o peróxido como substrato. Terminado o teste, o desenvolvimento de cor sugere a presença de antígeno VIH ou de anticorpos anti-VIH, enquanto que uma coloração tênue ou nula sugere a ausência dos mesmos.

Os poços microelisa são revestidos com gp160⁽²⁾ de VIH-1, péptido de ANT70 de VIH-1^(3,4), péptido env de VIH-2 (aminoácidos 592-603)⁽⁵⁾ e anticorpo anti-p24 de VIH-1. Cada poço microelisa contém uma esfera de conjugado constituído pela mesma mistura de antígenos VIH e de anticorpos VIH marcados com HRP. Em primeiro lugar, deve adicionar-se o diluente da amostra que irá dissolver a esfera de conjugado. Em seguida, deve adicionar-se a amostra ou o controlo adequado contendo anticorpos ou antígenos VIH que são então incubados nos poços microelisa. Se existirem anticorpos VIH-1 e/ou VIH-2 na amostra, forma-se um complexo: antígeno em fase sólida/anticorpos anti-VIH/antígeno marcado com enzima. Se estiver presente na amostra antígeno VIH-1, forma-se um complexo: anticorpo em fase sólida/antígeno

de contaminação microbiana. Se for necessário armazenar durante mais tempo, as amostras devem ser congeladas a uma temperatura inferior ou igual a -20 °C. Devem ser evitadas condições que possam favorecer o aparecimento de microrganismos.

A qualidade das amostras pode ser gravemente afectada pelo desenvolvimento microbiano, que pode originar falsos resultados.

- As amostras não devem ser submetidas a mais do que três ciclos de congelação e descongelação, por tal poder originar falsos resultados. A inactivação pelo calor a 56 °C durante 30 minutos pode afectar a detecção do antígeno VIH.
- As amostras devem ser estabilizadas à temperatura ambiente (15 a 30 °C) antes de iniciar o teste.
- Não é aconselhado o armazenamento de amostras em congeladores com descongelação automática.
- A presença de ácido sódico em suspensão nas amostras pode levar a falsos resultados.

7 Segurança pessoal

- Manipular todos os materiais de Vironostika® HIV Ag/Ab cuidadosamente, por se tratarem de produtos potencialmente infecciosos. O antígeno viral utilizado para revestir as tiras microelisa e para o conjugado e o antígeno viral usado para o controlo positivo de antígeno VIH-1 foram testados para inactivar o VIH. Os componentes desta embalagem, preparados a partir de soro ou plasma humano, foram testados e considerados não reactivos para os anticorpos contra o VIH-1, VIH-2, anticorpos do vírus da hepatite C (VHC), bem como o antígeno de superfície do vírus da hepatite B (HBsAg). No entanto, não podendo nenhum teste dar uma garantia absoluta, deve este produto ser manipulado com as precauções de utilização relativas aos produtos potencialmente infecciosos.
- Usar luvas de utilização única e manipular todos os materiais usados no teste, incluindo as amostras, solução de lavagem, recipientes de reacção e pipetas, cuidadosamente, por se tratarem de produtos potencialmente infecciosos, por ex., de acordo com a NCCLS M29-A2*. Consultar imediatamente um médico se os materiais contaminados forem ingeridos ou entrarem em contacto com as mucosas (olhos, boca) ou feridas.
- NCCLS M29-A2 Protection of Laboratory Workers from Occupationally Acquired Infections - Second Edition; Approved Guideline [ISBN 1-56238-453-8].

Limpeza e descontaminação

- Limpar imediatamente qualquer derrame de material potencialmente contaminado, por exemplo, com papel absorvente e a área contaminada deverá ser descontaminada, por exemplo, com uma solução de hipoclorito de sódio a 0,5 % preparada recentemente (dilução a 1 : 10 de hipoclorito de sódio a 5 % (lívia doméstica)) antes de prosseguir com o trabalho.

O hipoclorito de sódio não deve ser utilizado se houver qualquer derrame que contenha ácido, a não ser que a área onde se deu o derrame já tenha sido limpa.

- Os materiais utilizados para limpar derrames, incluindo luvas, deverão ser eliminados como sendo material potencialmente perigoso para o ambiente, por exemplo, num contentor próprio para resíduos contaminados.

Eliminação e destruição

- Descontaminar e/ou autoclavar as soluções ou resíduos de lavagem contendo amostras biológicas antes de as eliminar, em conformidade com a legislação local.
- As amostras e reagentes de origem humana e animal, bem como os materiais contaminados descartáveis, ácidos neutralizados e outros resíduos de produtos devem ser eliminados após descontaminação por um dos seguintes métodos:
 - Inversão durante 30 minutos numa solução recentemente preparada com 0,5 % de hipoclorito de sódio (1 volume de 5 % de hipoclorito de sódio para 10 volumes de fluido ou água contaminados).
- **Neutralizar (quimicamente) os resíduos líquidos que contêm ácido antes de adicionar hipoclorito de sódio**
 - ou autoclavar a 121 °C durante 60 minutos. A desinfecção por autoclavagem é o melhor método para inactivar o VIH e VHB. Não autoclavar materiais ou soluções que contenham hipoclorito de sódio.
- Os químicos têm de ser manipulados de acordo com Boas Práticas Laboratoriais e eliminados de acordo com as instruções locais.

Substâncias perigosas ou irritantes

- O ácido sulfúrico para a solução de paragem é corrosivo e deverá ser cuidadosamente manipulado. Se a solução de paragem entrar em contacto com a pele ou os olhos, lavar vigorosamente com muita água.

8 Preparação do reagente

Preparar os seguintes reagentes antes de efectuar o teste. Os reagentes e as amostras devem ser colocados à temperatura ambiente (15 a 30 °C) antes de iniciar o teste e podem permanecer à temperatura ambiente

durante o mesmo. Conservar os reagentes entre 2 e 8 °C quando não estiverem a ser usados. Todos os recipientes usados na preparação dos reagentes devem ser limpos rigorosamente e enaguados com água destilada ou desionizada antes de os utilizar. Evitar tanto quanto possível a contaminação microbiana dos reagentes.

Tiras de microelisa

Colocar a embalagem metalizada à temperatura ambiente (15 a 30 °C) antes de abrir, para impedir a condensação nas tiras de microelisa. Depois da embalagem metalizada de origem ter sido aberta, as tiras com as fitas adesivas não danificadas mantêm-se estáveis durante 4 semanas entre 2 e 8 °C, se a embalagem for sempre fechada hermeticamente com a pinça e o bastão fornecidos. Após a abertura, anotar o prazo de validade na etiqueta. A saqueta/sachet de sílica não deve ser removida da embalagem.

A etiqueta metálica contém quatro etiquetas em formato de código de barras para o processamento automático da placa de tiras. Deve ser colada uma nova etiqueta no suporte da tira para cada série.

Tampão fosfato

Verificar se o tampão fosfato concentrado contém cristais de sal. Caso se formem cristais na solução, dissolver novamente aquecendo a 37 °C até todos os cristais estarem dissolvidos.

Diluir 1 : 25 o tampão fosfato concentrado, em água destilada ou desionizada. Por exemplo, vertir o conteúdo da solução tampão concentrada (100 ml) num frasco e perfazer com água até 2500 ml. Preparar, pelo menos, 25 ml de solução tampão diluída por cada tira de microelisa utilizada (1 ml de tampão concentrado e 24 ml de água), mais o volume necessário de iniciador para os aparelhos individuais. Misturar bem antes de usar. A solução de tampão fosfato mantém-se estável durante 2 semanas entre 2 e 8 °C. Anotar a data de validade na etiqueta fornecida na embalagem.

Substrato TMB

Para preparar o substrato TMB, juntar num frasco de utilização única a quantidade necessária de solução TMB, em partes iguais com a solução de peróxido de ureia, de acordo com o número de poços a serem utilizados (consultar a tabela abaixo). Misturar bem. Evitar que a solução TMB e o substrato TMB sejam expostos a luz excessiva. O substrato TMB deve estar praticamente incolor quando usado. Nota: As soluções que contêm TMB ou peróxido de ureia não devem entrar em contacto com metal ou iões metálicos, porque isso pode dar origem à formação indesejada de cor. O substrato TMB permanece estável durante 8 horas à temperatura ambiente (15 a 30 °C), se for conservado no escuro. Anotar a data de validade na etiqueta fornecida na embalagem.

Preparação do substrato TMB

	TMB (LTC)		OP (TUC)
Número de poços	Solução TMB	+	Solução de peróxido de ureia
1 - 16	1,5 ml	+	1,5 ml
17 - 32	2,5 ml	+	2,5 ml
33 - 48	3 ml	+	3 ml
49 - 64	4 ml	+	4 ml
65 - 80	5 ml	+	5 ml
81 - 96	6 ml	+	6 ml

Ácido sulfúrico

O ácido sulfúrico deve ser tratado com cuidado para evitar o contato com a pele e olhos. Nota: Quando preparar ácido sulfúrico diluído (1 mol/l) de uma solução concentrada, lembre-se que o ácido deve ser adicionado lentamente na água enquanto agita (por exemplo, 50 ml de ácido concentrado (18 mol/l) a 850 ml de água destilada ou desionizada). É fornecida na embalagem uma etiqueta para a solução de trabalho.

9 Condições de armazenamento e estabilidade dos reagentes

Armazenar os componentes fechados entre 2 e 8 °C

Os componentes têm uma duração limitada após a sua abertura e/ou preparação:

Tiras de microelisa	4 semanas	2 a 8 °C	na embalagem fechada
Solução de tampão fosfato	2 semanas	2 a 8 °C	após a preparação
Substrato de TMB	8 horas	15 a 30 °C	se mantido no escuro

Diluyente da amostra, concentrado de tampão fosfato, solução TMB, solução de peróxido de ureia, controles negativo e positivo	16 semanas	2 a 8 °C	no recipiente original
---	------------	----------	------------------------

Nota: Os componentes, fechados ou abertos, não podem ser utilizados depois da data de validade indicada na etiqueta de cada componente.

10 Precauções de utilização

- Não troque os componentes específicos do teste com o código de teste **A6** entre os dispositivos com diferentes códigos do lote.
- Não misturar os componentes específicos do teste com o código de teste **A6** entre embalagens com diferentes códigos de dispositivos.
- Verificar toda a embalagem antes de a utilizar. O facto de a embalagem estar danificada não impede a utilização do seu conteúdo. No entanto, se a embalagem externa estiver danificada, o utilizador deve verificar se os componentes desta estão intactos antes de os utilizar.
- Se observar alterações físicas nos materiais da embalagem, tal indica deterioração.
- Não efectuar o teste na presença de vapores reactivos (por exemplo, de hipoclorito de sódio, ácidos, álcalis ou aldeídos) ou pó, porque a actividade enzimática do conjugado pode ser afectada.
- As tiras da placa microdisco são removíveis. Conservar as tiras não usadas tal como descrito no ponto a.
- Verificar se as esteras de conjugado estão no fundo dos pocos antes da remoção das fitas adesivas das tiras. Verificar que os seladores das tiras são completamente removidos antes de as utilizar. Antes de iniciar o teste, inspecionar o suporte de tiras microelisa e assegurar-se de que estão fixas. Os suportes de tiras devem ser manipulados cuidadosamente para evitar, que, as tiras se desloquem durante o teste.
- As tiras microelisa são de utilização única.
- Todos os reagentes e amostras devem ser bem homogeneizados antes da utilização.
- Para evitar a contaminação, não tocar com os dedos ou com as pontas das pipetas no topo ou no fundo das tiras, nos contornos dos pocos ou no líquido e na estera do conjugado contido nos pocos.
- Todas as etapas de pipetagem devem ser realizadas com o máximo cuidado e exactidão.
- A contaminação cruzada entre os reagentes e as amostras invalidará os resultados. Evitar a contaminação microbiana ou outro tipo de contaminação dos reagentes.
- Remover quaisquer bolhas de ar dos pocos, batendo, por exemplo, suavemente nas tiras.
- Não permitir que os pocos microelisa sequem após o início do teste.
- Dependendo do tipo de incubadora, pode ser necessário evitar a evaporação tapando as tiras das placas com uma fita adesiva de placas; remova a fita adesiva da placa antes de a lavar.
- Recomenda-se uma manutenção de rotina do sistema de expiração e lavagem para evitar a contaminação cruzada entre as amostras.

11 Procedimento do teste

- 1 Colocar no suporte de tiras o número necessário de tiras microelisa.
Remover a fita adesiva das tiras.
Nota: Os pocos podem ser inspecionados visualmente após a adição do diluyente da amostra, das amostras e dos controles: após a adição do diluyente da amostra, a estera de conjugado de cor púrpura dissolve-se dando uma solução verde; esta solução torna-se azul/púrpura após adição da amostra ou do controlo.
- 2 Pipetar 100 µl de diluyente de amostras para todos os pocos, isto é, incluindo os pocos de controlo.
- 3 Pipetar **50 µl de amostra** ou de **controlo** nos pocos. Incluir **três** controlos negativos: **um** controlo positivo de anti-VIH-1, **um** controlo positivo de anti-VIH-2 e **um** controlo positivo do antígeno VIH-1 em cada suporte de tiras. Pipetar sempre os controlos depois das amostras.
Encher os pocos não usados com diluyente da amostra para dissolver a estera do conjugado, evitando assim a danificação do sistema de aspiração e lavagem.
- 4 Agitar bem (usando, por exemplo, um vortex, com velocidade aproximada de 15 Hz (= 900 rotações por minuto) durante 15 segundos ou equivalente).
Incubar as tiras a 37 °C durante 60 ± 5 minutos.
- 5 Lavar cada poço **seis** vezes com solução tampão fosfato.

- Uma lavagem incompleta pode afectar os resultados do teste.
- Aspirar completamente o conteúdo dos pocos para um frasco de resíduos. Depois encher completamente os pocos com tampão fosfato evitando o derramamento de um poço para outro e deixar ficar durante 30 a 60 segundos. Aspirar completamente e repetir o procedimento de lavagem mais cinco vezes num total de seis lavagens.

- E preferível lavar os pocos enchendo-os com um volume de fluido maior do que o volume do poço enquanto aspira, ao mesmo tempo, o volume em excesso para evitar o derramamento.
- Remover qualquer fluido que permaneceu na parte superior e ou inferior das tiras microelisa e no suporte das tiras após a última aspiração; passando, por exemplo, com um pano absorvente.

6 Pipetar 100 µl de substrato TMB em cada poço. Não misture nem agitar.

7 Incubar as tiras entre 15 e 30 °C durante 30 ± 2 minutos no escuro.

8 Parar a reacção adicionando 100 µl de ácido sulfúrico em cada poço mantendo a mesma sequência de pipetagem e intervalos de tempo usados na adição do substrato TMB. Certificar-se de boa homogeneização, por exemplo, batendo no lado do suporte de tiras. As placas devem ser lidas no intervalo de 15 minutos.

9 Fazer a leitura do branco contra o ar. Isto é, sem o suporte de placas nem placas, e ler o nível de absorção da solução de cada poço a 450 nm e 620 a 700 nm como referência (complemento de onda duplo).

12 Resultados

Cálculo manual

Os cálculos devem ser efectuados separadamente para cada placa.

NC = Absorvância do controlo negativo

PC1 = Absorvância do controlo positivo de anti-VIH-1

PC2 = Absorvância do controlo positivo de anti-VIH-2

PC3 = Absorvância do controlo positivo do antígeno do VIH-1

Qualificação dos valores NC

1 O NC deve ser < 0,250. Eliminar quaisquer NC ≥ 0,250.

2 Determinar o valor médio (NCx) dos restantes controlos.

3 O NC deve ser ≤ 1,4NCx. Eliminar quaisquer NC > 1,4NCx e calcular novamente o NCx.

4 O NC deve ser ≥ 0,6NCx. Eliminar quaisquer NC < 0,6NCx e calcular novamente o NCx.

5 Repetir as etapas 3 e 4 até deixar de encontrar valores aberrantes.

Validação do teste

Considera-se que uma série de testes é válida se

1 permanecerem mais de metade do número de controlos negativos;

2 PC1 – NCx ≥ 0,600;

3 PC2 – NCx ≥ 0,600;

4 PC3 – NCx ≥ 0,400.

Valor do "Cutoff"

Se a série de testes for válida, calcular o valor de "cutoff" + 0,100.

Uma amostra é reactiva se a sua absorvância for ≥ ao valor de "cutoff".

Uma amostra é não reactiva se a sua absorvância for < ao valor de "cutoff".

Exemplo de cálculo

NC = 0,089; 0,096; 0,088 NCx = 0,091

PC1 = 1,549

PC2 = 1,523

PC3 = 1,398

Eliminar qualquer controlo com valores aberrantes:

NC ≥ 0,250 Nenhum eliminado

NC > 1,4NCx Nenhum eliminado

NC < 0,6NCx 0,6(0,091) = 0,055 Nenhum eliminado

Assegurar-se de que os seguintes valores são aceites:

PC1 – NCx ≥ 0,600 1,249 – 0,091 = 1,458 Verificado

PC2 – NCx ≥ 0,600 1,523 – 0,091 = 1,432 Verificado

PC3 – NCx ≥ 0,400 1,398 – 0,091 = 1,307 Verificado

Calcular o valor de "cut-off":

$$\text{Cut-off} = \text{NCx} + 0,100 = 0,091 + 0,100 = 0,191$$

Interpretação dos resultados

- Um resultado não reactivo indica que a amostra testada não contém anti-VIH-1, anti-VIH-2, anti-VIH-1 do grupo O nem antígeno VIH-1 ou que os contêm abaixo do limite de detecção de Vironostika® HIV Ag/Ab.
- Um resultado reactivo indica que a amostra testada contém anticorpos anti-VIH-1, anti-VIH-2, anti-VIH-1 do grupo O e/ou o antígeno VIH-1 ou um factor que reage inespecificamente.
- As amostras que apresentem um resultado inicialmente reactivo devem ser testadas novamente, em duplicado. Apenas as amostras reactivas em pelo menos um dos duplicados, devem ser consideradas reactivas para os anticorpos anti-VIH-1, anti-VIH-2, anti-VIH-1 do grupo O e/ou antígeno VIH-1.
- Por todos os sistemas de imunossoro serem altamente sensíveis têm um potencial para reacções não específicas, os resultados de amostras repetidamente reactivas devem ser verificados usando um outro método apropriado. Devido à elevada sensibilidade do Vironostika® HIV Ag/Ab em amostras de seroconversão recentes, é recomendado incluir um teste sensível ao antígeno VIH no teste de confirmação.
- As amostras que não se confirmarem reactivas no teste em duplicado devem ser consideradas como não reactivas. Os resultados reactivos não confirmados podem ser devidos a um ou mais dos seguintes problemas técnicos:
 - Contaminação cruzada pelo equipamento ou pontas de pipeta contaminados por uma amostra muito reactiva.
 - Contaminação do substrato por íões metálicos.
 - Contaminação cruzada devido à mistura ou por gotículas de reagente.
 - Lavagem ou aspiração inadequada.
 - Erros de leitura; por exemplo, devido a gotas de líquido sob o poço ou bolhas de ar no poço.

13 Processamento automático

Aparelhos e programas informáticos, com os respectivos protocolos de processamento e de cálculo, estão disponíveis na bioMérieux para o processamento automático e cálculo dos resultados dos testes Vironostika® HIV Ag/Ab. Na tabela seguinte são apresentados os protocolos a serem utilizados e um resumo das etapas de processamento do Vironostika® HIV Ag/Ab.

protocolo	A. homogeneizar	incubar a	incubar durante	ler a
ABVSOP01	15 s	37 °C	60 min	450; 620 - 700 nm

Nota: São fornecidas etiquetas de códigos de barras para a identificação do protocolo, do reagente e da solução de trabalho a utilizar no processamento automático.

14 Comportamento funcional

O comportamento funcional correcto deste produto de diagnóstico *in vitro* só pode ser garantido pela bioMérieux se for utilizado para o fim a que se destina e em conformidade com as instruções de utilização, e quando adequado juntamente com outros dispositivos médicos para diagnóstico *in vitro*, bem como acessórios fornecidos e/ou qualificados pela bioMérieux.

Para informações complementares de orientação sobre outras condições de utilização, contactar o seu representante local da bioMérieux.

Os Laboratórios de Desenvolvimento da bioMérieux avaliaram duas embalagens de Vironostika® HIV Ag/Ab que demonstraram estar em conformidade com as Especificações Técnicas Comuns (2009/886/EC) da Directiva 98/79/EC. Abaixo apresentam-se os resultados tipicamente obtidos durante esta avaliação de comportamento funcional:

Sensibilidade de diagnóstico

Um total de 30 painéis de seroconversão comercialmente disponíveis de VIH foram testados para avaliar a capacidade do ensaio em detectar infecções recentes. Entre estes 6 painéis de seroconversão, 6 amostras de sangue foram consideradas positivas (distribuídas pelos 6 painéis) com Vironostika® HIV Ag/Ab por comparação com um teste de referência com marcação CE HIV Ag/Ab. Foram detectadas 24 amostras adicionais (distribuídas por 19 painéis) com Vironostika® HIV Ag/Ab e comparadas com um teste de referência com marcação CE de anticorpos HIV apenas como teste de referência para anticorpos HIV. Dos

30 painéis testados, todas as amostras VIH de seroconversão deram resultado positivo com Vironostika® HIV Ag/Ab. Foram testadas mais de 40 amostras por seroconversão VIH precoce. Os resultados estão em conformidade com o estado de arte.

Um total de 400 anti HIV-1, 100 anti HIV-2 e 50 amostras confirmadas positivas de antígeno HIV p24 foram testadas com Vironostika® HIV Ag/Ab.

Quadro 1: Sensibilidade de diagnóstico para anticorpos VIH e antígeno p24 com amostras positivas

Nº de amostras	sensibilidade
400 anti-VIH-1	100 %
100 anti-VIH-2	100 %
50 antígeno VIH	100 %

As amostras conhecidas por conterem altas concentrações de anti-VIH não interferiram com a detecção; i.e. não foi observado nenhum efeito de zona relevante.

- De modo a verificar a sensibilidade do teste Vironostika® HIV Ag/Ab em subtipos não B, 37 amostras do grupo M (4A, 4C, 4D, 4F, 4G, 4H, 1J e 12 CRF) e foram testadas 10 amostras do grupo O.
- Todas as amostras foram consideradas positivas.
- Pelo menos, 25 amostras recentes do mesmo dia (≤ 1 dia após colheita/coleta) confirmadas como verdadeiras positivas, foram testadas como reactivas com Vironostika® HIV Ag/Ab.

Especificidade de diagnóstico

O Vironostika® HIV Ag/Ab demonstrou uma especificidade ≥ 99,5 % com amostras de uma população de doadores de sangue europeus.

Um total de 5015 amostras de doadores de sangue de rotina (soro/plasma) foram testadas com dois diferentes centros de testes europeus.

Besides nestes resultados, a especificidade inicial de diagnóstico estimado de Vironostika® HIV Ag/Ab com amostras de sangue negativo de doadores foi de 99,76 % com 99 % de limite de confiança [99,52 % - 99,90 %]. Pode haver desvios de comportamento funcional consoante as populações e os laboratórios.

Sensibilidade analítica

A sensibilidade analítica de Vironostika® HIV Ag/Ab, determinada contra a primeira norma internacional (NIBSC 90/636), foi avaliada a 7.1 UI/ml de antígeno VIH-1.

Especificidade analítica

Um total de 111 amostras com substâncias potencialmente interferentes, não relacionadas com VIH, e 200 amostras de doentes hospitalizados, foram testadas para avaliar a especificidade analítica. Os resultados são apresentados abaixo:

Quadro 2: A especificidade analítica com amostras de doentes hospitalizados e amostras que contêm factores potenciais de reacção cruzada.

Amostras que contêm	# Amostras testadas	Resultado negativo	Resultado positivo
Factor reumatóide	10	10	0
Anticorpos antinucleares	10	10	0
anti-HTLV	7	7	0
HBSAg	10	10	0
anti-HBs	4	4	0
HBeAg	10	10	0
Anticorpos anti - HBc	10	10	0
Mulheres grávidas	10	10	0
Níveis elevados de bilirrubina	10	10	0
Níveis elevados de hemoglobina	10	10	0
Níveis elevados de proteína	10	10	0
Níveis elevados de lípidos	10	10	0
Doentes hospitalizados	200	199	1

Nota: Uma amostra de doente hospitalizado foi testada reactiva com Vironostika® HIV Ag/Ab. Visto que foi confirmado como verdadeiro negativo por outros dois métodos, o resultado Vironostika® HIV Ag/Ab reactivo foi considerado como um falso positivo.

Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi avaliada utilizando os controles da amostra e 3 amostras positivas. A reprodutibilidade foi avaliada em 25 séries independentes durante vários dias. E apresentada abaixo uma visão geral dos resultados:

Quadro 3: Reprodutibilidade

	n	média DO	SD	Total	CV %
Negativa	74	0,085	0,025		28,9
anti-VIH-1 positivo fraco	68	0,443	0,045		10,2
anti-VIH-1 positivo forte	25	2,063	0,114		5,5
anti-VIH-2 positivo fraco	68	0,394	0,036		9,1
anti-VIH-2 positivo forte	25	1,869	0,076		4,0
VIH-1 Ag positivo fraco	67	0,341	0,042		12,2
VIH-1 Ag positivo forte	25	1,320	0,087		6,6

Limitações do procedimento

- 1 Todos os sistemas de imunoenensaio altamente sensíveis têm potencial para reações não específicas, pelo que, as amostras repetidamente reactivas devem ser verificadas através da utilização de um método apropriado, por exemplo NAT para VIH.
- 2 O Vironostika® HIV Ag/Ag não deve ser utilizado como teste específico para a detecção de antígeno VIH p24.
- 3 Um resultado de teste não reactivo não exclui a possibilidade de infecção de VIH por o antígeno VIH p24 ou o título de anticorpo anti-VIH poder estar abaixo do limite de detecção do teste

15 Apresentação

Vironostika® HIV Ag/Ab

Número de testes por embalagem	Referência de catálogo
REF	259851
REF	259852

Para assistência técnica, contactar o seu representante local da bioMérieux. Estão disponíveis a pedido as fichas de Segurança destes produtos (MSDS).

Brasil:

Distribuído por:
bioMérieux Brasil S.A.
Estrada do Mapua, 491
Jacarepaguá - RJ
CEP 22.710-261
CNPJ: 33.040.635/0001-71
Atendimento ao consumidor: Tel: 0800 – 26 48 48

Prazo de Validade, No de Lote, No de Registro de Ministério da Saúde e Responsável Técnico:
VIDE EMBALAGEM

CE 0459

A bioMérieux, o logotipo anti e Vironostika são marcas utilizadas, depositadas e/ou registadas, propriedade exclusiva da bioMérieux SA ou de uma das suas filiais.

16 Explicação dos símbolos

Nomes e códigos dos reagentes da bioMérieux para processamento automático

REF	Nome
REF	Símbolo do reagente para o controlo negativo
REF	Símbolo do reagente para o controlo positivo anti-VIH-1
REF	Símbolo do reagente para o controlo positivo anti-VIH-2
REF	Símbolo do reagente para o controlo positivo do antígeno VIH-1
REF	Símbolo do reagente para o diluente de amostras
REF	Símbolo do reagente para o concentrado do tampão de lavagem (25x)

REF

Símbolo do reagente para o tampão fosfato
Símbolo do reagente para a solução TMB
Símbolo do reagente para o substrato TMB + UP

Símbolo do reagente para a solução de peróxido de ureia
Símbolo do reagente para ácido sulfúrico 1 mol/l

Código do reagente para o controlo negativo

Código do reagente para o controlo positivo do anti-VIH-1
Código do reagente para o controlo positivo do anti-VIH-2

Código do reagente para o controlo positivo do antígeno VIH-1

Código do reagente para o diluente de amostras

Código do reagente para o concentrado do tampão fosfato

Código do reagente para o tampão fosfato

Código do reagente para a solução TMB

Código do reagente para a solução de peróxido de ureia

Código reagente para o substrato TMB/UP

Código do reagente para ácido sulfúrico 1 mol/l

Versão do ensaio

Reagentes fechados

Placa de tias de microelisa

Colheita/coleta de amostras

Preparação do reagente/solução de trabalho

Procedimento de lavagem

Protocolo de processamento e cálculo

Ler a ... nm

Pipetar ... µl

Misturar durante ... seg

Incubar durante ... min

Incubar a ... °C

Parar a reacção

Símbolos Internacionais

REF	Nome
REF	Código do lote
REF	Dispositivo Médico para Diagnóstico <i>In Vitro</i>
REF	Limites de temperatura
REF	Prazo de validade
REF	Conteúdo suficiente para "n" ensaios
REF	Marca de conformidade CE
REF	Identificação do organismo notificado
REF	Consulte as instruções de utilização
REF	Fabricante
REF	Referência do catálogo

17 Representação esquemática do procedimento do teste

Ver contra-capa.

259851 - 259852 - Package Insert - 14680 E
2010 - 04

Anexo 5: Protocolo Doseamento de IgG

HUMAN IgG

Immunoperoxidase Assay for Determination of IgG in Human Samples

DIRECTIONS FOR USE

Version3 4.0 -- 27

For Research Use Only, NOT for Diagnostic Purposes

Please Read this Package Insert Completely Before Using This Product

INTENDED USE

The total Human IgG test kit is a highly sensitive two-site enzyme linked immunoassay (ELISA) for measuring IgG in Human Biological Samples.

PRINCIPLE OF THE ASSAY

The principle of the double antibody sandwich ELISA is represented in Figure 1. In this assay the IgG present in samples reacts with the anti-IgG antibodies which have been adsorbed to the surface of polystyrene microtitre wells. After the removal of unbound proteins by washing, anti-IgG antibodies conjugated with horseradish peroxidase (HRP), are added. These enzyme-labeled antibodies form complexes with the previously bound IgG. Following another washing step, the enzyme bound to the immunosorbent is assayed by the addition of a chromogenic substrate, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). The quantity of bound enzyme varies directly with the concentration of IgG in the sample tested; thus, the absorbance, at 450 nm, is a measure of the concentration of IgG in the test sample. The quantity of IgG in the test sample can be interpolated from the standard curve constructed from the standards, and corrected for sample dilution.

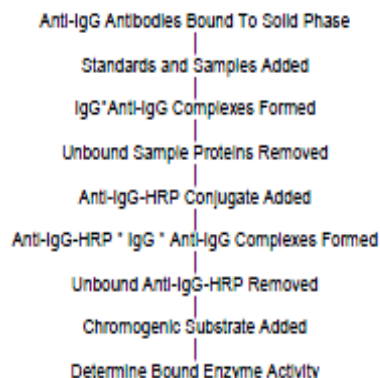


Figure 1.

REAGENTS (Quantities sufficient for 96 determinations)

- 1. DILUENT CONCENTRATE (Running Buffer)**
One bottle containing 50 ml of a 5X concentrated diluent running buffer.
- 2. WASH SOLUTION CONCENTRATE**
One bottle containing 50 ml of a 20X concentrated wash solution.
- 3. ENZYME-ANTIBODY CONJUGATE 100X**
One vial containing 150 µL of affinity purified anti-Human IgG antibody conjugated with horseradish peroxidase in a stabilizing buffer.
- 4. CHROMOGEN-SUBSTRATE SOLUTION**
One vial containing 12 mL of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) and hydrogen peroxide in citric acid buffer at pH 3.3.
- 5. STOP SOLUTION**
One vial containing 12 ml 0.3 M sulfuric acid.

WARNING: Avoid contact with skin.

- 6. ANTI-HUMAN IgG ELISA MICRO PLATE**
Twelve removable eight (8) well micro well strips in well holder frame. Each well is coated with affinity purified anti-Human IgG.

- 7. HUMAN IgG CALIBRATOR**
One vial containing Human IgG calibrator.

FOR IN VITRO USE ONLY

REAGENT PREPARATION

- 1. DILUENT CONCENTRATE**
The Diluent Solution supplied is a 5X Concentrate and must be diluted 1/5 with distilled or deionized water (1 part buffer concentrate, 4 parts dH₂O).

2. WASH SOLUTION CONCENTRATE

The Wash Solution supplied is a 20X Concentrate and must be diluted 1/20 with distilled or deionized water (1 part buffer concentrate, 19 parts dH₂O). Crystal formation in the concentrate is not uncommon when storage temperatures are low. Warming of the concentrate to 30-35°C before dilution can dissolve crystals.

3. ENZYME-ANTIBODY CONJUGATE

Calculate the required amount of working conjugate solution for each microtitre plate test strip by adding 10 µL Enzyme-Antibody Conjugate to 990 µL of 1X Diluent for each test strip to be used for testing. Mix uniformly, but gently. Avoid foaming.

4. CHROMOGEN-SUBSTRATE SOLUTION

Ready to use as supplied.

5. STOP SOLUTION

Ready to use as supplied.

6. ANTI-HUMAN IgG ELISA MICRO PLATE

Ready to use as supplied. Unseal Microtiter Pouch and remove plate from pouch. Remove all strips and wells that will not be used in the assay and place back in pouch and re-seal along with desiccant.

7. HUMAN IgG CALIBRATOR

The calibrator is now at a concentration of 7.35 mg/ml. Human IgG standards need to be prepared immediately prior to use (see chart below). Mix well between each step. Avoid foaming. For samples containing lower levels of IgG, it is possible to extend the utility of the lower detection limit of this assay by making a 2-fold dilution of standard # 1.

Standard	ng/ml	Volume added to 1x Diluent →	Volume of 1x Diluent
A	73500	5 µl Human IgG Calibrator	495 µl
6	500	5 µl standard A	730 µl
5	250	300 µl standard 6	300 µl
4	125	300 µl standard 5	300 µl
3	62.5	300 µl standard 4	300 µl
2	31.25	300 µl standard 3	300 µl
1	15.6	300 µl standard 2	300 µl
0	0		600 µl

STORAGE AND STABILITY

The expiration date for the package is stated on the box label.

1. DILUENT

The 5X Diluent Concentrate is stable until the expiration date. The 1X working solution is stable for at least one week from the date of preparation. Both solutions should be stored at 4-8°C.

2. WASH SOLUTION

The 20X Wash Solution Concentrate is stable until the expiration date. The 1X working solution is stable for at least one week from the date of preparation. Both solutions can be stored at room temperature (16-25°C) or at 4-8°C.

3. ENZYME-ANTIBODY CONJUGATE

Undiluted horseradish peroxidase anti-IgG conjugate should be stored at 4-8°C and **diluted immediately prior to use**. The working conjugate solution is stable for up to 1 hour when stored in the dark.

4. CHROMOGEN-SUBSTRATE SOLUTION

The Substrate Solution should be stored at 4-8°C and is stable until the expiration date.

5. STOP SOLUTION

The Stop Solution should be stored at 4-8°C and is stable until the expiration date.

6. ANTI-HUMAN IgG ELISA MICRO PLATE

Anti-Human IgG coated wells are stable until the expiration date, and should be stored at 4-8°C in sealed foil pouch with desiccant pack.

7. HUMAN IgG CALIBRATOR

Long Term Storage: Upon receipt, aliquot the calibrator and store them frozen. They will be stable until expiration date. Short Term Storage: the calibrator is stable for up to 14 days at 4°C. The working standard solutions should be prepared immediately prior to use and are stable for up to 8 hours.

INDICATIONS OF INSTABILITY

If the test is performing correctly, the results observed with the standard solutions should be within 20 % of the expected values.

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Blood should be collected by venipuncture. The serum should be separated from the cells after clot formation by centrifugation. For plasma samples, blood should be collected into a container with an anticoagulant and then centrifuged. Care should be taken to minimize hemolysis, excessive hemolysis can impact your results. Assay immediately or aliquot and store samples at -20°C. Avoid repeated freeze-thaw cycles.

1. Precautions

For any sample that might contain pathogens, care must be taken to prevent contact with open wounds.

2. Additives and Preservatives

No additives or preservatives are necessary to maintain the integrity of the specimen. Avoid azide contamination.

3. Known interfering substances

Azide and thimerosal at concentrations higher than 0.1% inhibits the enzyme reaction.

MATERIAL PROVIDED

See "REAGENTS"

MATERIALS REQUIRED**BUT NOT PROVIDED**

- Precision pipette (2 μ L to 200 μ L) for making and dispensing dilutions
- Test tubes
- Microtitre washer/aspirator
- Distilled or Deionized H₂O
- Microtitre Plate reader
- Assorted glassware for the preparation of reagents and buffer solutions
- Timer

ASSAY PROTOCOL**DILUTION OF SAMPLES**

The assay for quantification of IgG in samples requires that each test sample be diluted before use. For a single step determination a dilution of 1/80,000 is appropriate for most serum/plasma samples. For absolute quantification, samples that yield results outside the range of the standard curve, a lesser or greater dilution might be required. **If unsure of sample level, a serial dilution with one or two representative samples before running the entire plate is highly recommended.**

1. To prepare a 1/80,000 dilution of sample, transfer 2 μ L of sample to 1,998 μ L of 1X diluent. This gives you a 1/1,000 dilution. Next, dilute the 1/1,000 samples by transferring 5 μ L, to 395 μ L of 1X diluent. You now have a 1/80,000 dilution of your sample. Mix thoroughly at each stage.

PROCEDURE

1. Bring all reagents to room temperature before use.

2. Pipette 100 μ L of

- Standard 0 (0.0 ng/ml) in duplicate
- Standard 1 (15.6 ng/ml) in duplicate
- Standard 2 (31.25 ng/ml) in duplicate
- Standard 3 (62.5 ng/ml) in duplicate
- Standard 4 (125 ng/ml) in duplicate
- Standard 5 (250 ng/ml) in duplicate
- Standard 6 (500 ng/ml) in duplicate

3. Pipette 100 μ L of sample (in duplicate) into pre designated wells.

4. Incubate the micro titer plate at room temperature for sixty (60 \pm 2) minutes. Keep plate covered and level during incubation.

5. Following incubation, aspirate the contents of the wells.

6. Completely fill each well with appropriately diluted Wash Solution and aspirate. Repeat three times, for a total of four washes. If washing manually: completely fill wells with wash buffer, invert the plate then pour/shake out the contents in a waste container. Follow this by sharply striking the wells on absorbent paper to remove residual buffer. Repeat 3 times for a total of four washes.

7. Pipette 100 μ L of appropriately diluted Enzyme-Antibody Conjugate to each well. Incubate at room temperature for twenty (20 \pm 2) minutes. Keep plate covered in the dark and level during incubation.

8. Wash and blot the wells as described in Steps 5/6.

9. Pipette 100 μ L of TMB Substrate Solution into each well.

10. Incubate in the dark at room temperature for precisely ten (10) minutes.

11. After ten minutes, add 100 μ L of Stop Solution to each well.

12. Determine the absorbance (450 nm) of the contents of each well. Calibrate the plate reader to manufacturer's specifications.

STABILITY OF THE FINAL REACTION MIXTURE

The absorbance of the final reaction mixture can be measured up to 2 hours after the addition of the Stop Solution. However, good laboratory practice dictates that the measurement be made as soon as possible.

RESULTS

1. Subtract the average background value from the test values for each sample.
2. Using the results observed for the standards construct a Standard Curve. The appropriate curve fit is that of a four-parameter logistics curve. A second order polynomial (quadratic) or other curve fits may also be used.
3. Interpolate test sample values from standard curve. Correct for sera dilution factor to arrive at the IgG concentration in original samples.

2. Factors that might affect the performance of the assay include proper instrument function, cleanliness of glassware, quality of distilled or deionized water, and accuracy of reagent and sample pipettings, washing technique, incubation time or temperature.
3. Do not mix or substitute reagents with those from other lots or sources.

LIMITATION OF THE PROCEDURE

1. Reliable and reproducible results will be obtained when the assay procedure is carried out with a complete understanding of the information contained in the package insert instructions and with adherence to good laboratory practice.



Manufactured by:

Immunology Consultants Laboratory, Inc.
15,862 SW 72nd Avenue, #150 | Portland, OR 97224 | USA
Phone (503) 747-2454 | Fax (503) 747-2544

This document contains information that is proprietary to Immunology Consultants Laboratory. The original recipient of this document may duplicate this document in whole or in part for internal business purposes only, provided that this entire notice appears in all copies. In duplicating any part of this document, the recipient agrees to make every reasonable effort to prevent the unauthorized use and distribution of the proprietary information.

Anexo 6: Registo de Resultados

Amostra	Detecção Anticorpos anti-HIV		Doseamento Imunoglobulinas	Anticorpos anti- HIV
	EIA Genscreen	EIA Vironostika		
1	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
2	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
3	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
4	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
5	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
6	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
7	Positivo	Positivo		Positivo
8	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
9	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
10	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
11	Positivo	Positivo		Positivo
12	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
13	Positivo	Positivo		Positivo
14	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
15	Positivo	Positivo		Positivo
16	Positivo	Positivo		Positivo
17	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
18	Positivo	Positivo		Positivo
19	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
20	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
21	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
22	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
23	Positivo	Positivo		Positivo
24	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
25	Positivo	Negativo	$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
26	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
27	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
28	Positivo	Negativo	$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
29	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
30	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
31	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
32	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
33	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
34	Positivo	Negativo	$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
35	Positivo	Positivo		Positivo
36	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
37	Positivo	Positivo		Positivo
38	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo

39	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
40	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
41	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
42	Positivo	Positivo		Positivo
43	Negativo		$< 3,5\text{mg/L}$	Excluído
44	Positivo	Positivo		Positivo
45	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
46	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
47	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
48	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
49	Positivo	Positivo		Positivo
50	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
51	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
52	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
53	Positivo	Positivo		Positivo
54	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
55	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
56	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
57	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
58	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
59	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
60	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
61	Positivo	Positivo		Positivo
62	Positivo	Positivo		Positivo
63	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
64	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
65	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
66	Positivo	Positivo		Positivo
67	Positivo	Positivo		Positivo
68	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
69	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
70	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
71	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
72	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
73	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
74	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
75	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
76	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
77	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
78	Positivo	Positivo		Positivo
79	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
80	Negativo		$< 3,5\text{mg/L}$	Excluído

81	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
82	Positivo	Positivo		Positivo
83	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
84	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
85	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
86	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
87	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
88	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
89	Positivo	Positivo		Positivo
90	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
91	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
92	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
93	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
94	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
95	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
96	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
97	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
98	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
99	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
100	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
101	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
102	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
103	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
104	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
105	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
106	Positivo	Positivo		Positivo
107	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
108	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
109	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
110	Positivo	Positivo		Positivo
111	Negativo		$< 3,5\text{mg/L}$	Excluído
112	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
113	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
114	Negativo		$< 3,5\text{mg/L}$	Excluído
115	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
116	Negativo		$< 3,5\text{mg/L}$	Excluído
117	Negativo		$< 3,5\text{mg/L}$	Excluído
118	Negativo		$< 3,5\text{mg/L}$	Excluído
119	Negativo		$< 3,5\text{mg/L}$	Excluído
120	Positivo	Positivo		Positivo
121	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
122	Negativo		$< 3,5\text{mg/L}$	Excluído

123	Negativo		<3,5mg/L	Excluído
124	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo
125	Positivo	Positivo		Positivo
126	Positivo	Positivo		Positivo
127	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo
128	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo
129	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo
130	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo
131	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo
132	Negativo		<3,5mg/L	Excluído
133	Positivo	Negativo	<3,5mg/L	Excluído
134	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo
135	Positivo	Positivo		Positivo
136	Positivo	Positivo		Positivo
137	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo
138	Positivo	Negativo	≥3,5mg/L	Negativo
139	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo
140	Positivo	Negativo	≥3,5mg/L	Negativo
141	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo
142	Negativo		<3,5mg/L	Excluído
143	Negativo		<3,5mg/L	Excluído
144	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo
145	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo
146	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo
147	Negativo		<3,5mg/L	Excluído
148	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo
149	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo
150	Negativo		<3,5mg/L	Excluído
151	Positivo	Positivo		Positivo
152	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo
153	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo
154	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo
155	Positivo	Positivo		Positivo
156	Positivo	Positivo		Positivo
157	Positivo	Positivo		Positivo
158	Positivo	Negativo	≥3,5mg/L	Negativo
159	Positivo	Positivo		Positivo
160	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo
161	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo
162	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo
163	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo
164	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo

165	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
166	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
167	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
168	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
169	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
170	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
171	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
172	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
173	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
174	Positivo	Negativo	$< 3,5\text{mg/L}$	Excluído
175	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
176	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
177	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
178	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
179	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
180	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
181	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
182	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
183	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
184	Positivo	Positivo		Positivo
185	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
186	Positivo	Negativo	$< 3,5\text{mg/L}$	Excluído
187	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
188	Negativo		$< 3,5\text{mg/L}$	Excluído
189	Positivo	Positivo		Positivo
190	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
191	NA*	NA*	NA*	NA*
192	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
193	Negativo		$< 3,5\text{mg/L}$	Excluído
194	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
195	Negativo		$< 3,5\text{mg/L}$	Excluído
196	Positivo	Positivo		Positivo
197	Negativo		$< 3,5\text{mg/L}$	Excluído
198	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
199	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
200	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
201	Negativo		$< 3,5\text{mg/L}$	Excluído
202	Negativo		$< 3,5\text{mg/L}$	Excluído
203	Negativo		$< 3,5\text{mg/L}$	Excluído
204	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
205	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
206	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo

207	Positivo	Negativo	<3,5mg/L	Excluído
208	Positivo	Negativo	≥3,5mg/L	Negativo
209	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo
210	Positivo	Positivo		Positivo
211	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo
212	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo
213	Positivo	Positivo		Positivo
214	Positivo	Negativo	≥3,5mg/L	Negativo
215	Negativo		<3,5mg/L	Excluído
216	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo
217	Positivo	Negativo	<3,5mg/L	Excluído
218	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo
219	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo
220	Positivo	Positivo		Positivo
221	Negativo		<3,5mg/L	Excluído
222	Negativo		<3,5mg/L	Excluído
223	Negativo		<3,5mg/L	Excluído
224	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo
225	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo
226	Positivo	Positivo		Positivo
227	Positivo	Positivo		Positivo
228	Positivo	Positivo		Positivo
229	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo
230	Positivo	Negativo	≥3,5mg/L	Negativo
231	Positivo	Negativo	≥3,5mg/L	Negativo
232	Negativo		<3,5mg/L	Excluído
233	Positivo	Negativo	≥3,5mg/L	Negativo
234	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo
235	Positivo	Negativo	≥3,5mg/L	Negativo
236	Positivo	Negativo	≥3,5mg/L	Negativo
237	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo
238	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo
239	Positivo	Negativo	≥3,5mg/L	Negativo
240	Negativo		<3,5mg/L	Excluído
241	Positivo	Negativo	≥3,5mg/L	Negativo
242	Positivo	Negativo	≥3,5mg/L	Negativo
243	Negativo		<3,5mg/L	Excluído
244	Negativo		<3,5mg/L	Excluído
245	Negativo		<3,5mg/L	Excluído
246	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo
247	Positivo	Negativo	<3,5mg/L	Excluído
248	Negativo		≥3,5mg/L	Negativo

249	Positivo	Positivo		Positivo
250	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
251	Positivo	Positivo		Positivo
252	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
253	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
254	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
255	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
256	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
257	Positivo	Negativo	$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
258	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
259	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
260	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
261	Positivo	Positivo		Positivo
262	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
263	Positivo	Negativo	$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
264	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
265	Positivo	Negativo	$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
266	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
267	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
268	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
269	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
270	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
271	Positivo	Negativo	$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
272	Positivo	Positivo		Positivo
273	Positivo	Positivo		Positivo
274	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
275	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
276	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
277	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
278	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
279	Positivo	Negativo	$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
280	Positivo	Positivo		Positivo
281	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
282	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
283	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
284	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
285	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
286	Positivo	Positivo		Positivo
287	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
288	Positivo	Positivo		Positivo
289	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
290	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo

291	Positivo	Negativo	$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
292	Positivo	Negativo	$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
293	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
294	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
295	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
296	Positivo	Positivo		Positivo
297	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
298	Positivo	Negativo	$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
299	Positivo	Negativo	$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
300	Positivo	Positivo		Positivo
301	Positivo	Negativo	$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
302	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
303	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
304	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
305	Positivo	Positivo		Positivo
306	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
307	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
308	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
309	Positivo	Positivo		Positivo
310	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
311	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
312	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
313	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
314	Positivo	Positivo		Positivo
315	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
316	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
317	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
318	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
319	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
320	Positivo	Positivo		Positivo
321	Positivo	Positivo		Positivo
322	Positivo	Positivo		Positivo
323	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
324	Positivo	Positivo		Positivo
325	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
326	Positivo	Positivo		Positivo
327	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
328	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
329	Positivo	Negativo	$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
330	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
331	Positivo	Negativo	$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
332	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo

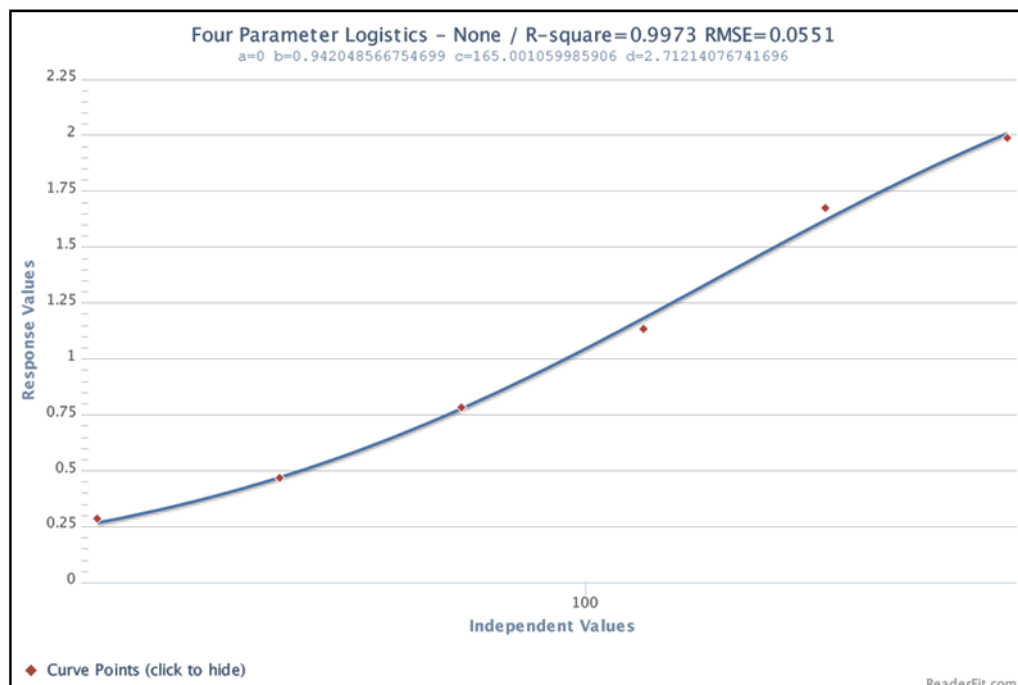
333	Positivo	Positivo		Positivo
334	Positivo	Positivo		Positivo
335	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
336	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
337	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
338	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
339	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
340	Positivo	Negativo	$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
341	Positivo	Negativo	$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
342	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
343	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
344	Positivo	Positivo		Positivo
345	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
346	Positivo	Positivo		Positivo
347	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
348	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
349	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
350	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
351	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
352	Positivo	Negativo	$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
353	Positivo	Negativo	$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
354	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
355	Positivo	Negativo	$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
356	Positivo	Negativo	$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
357	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
358	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
359	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
360	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
361	Positivo	Positivo		Positivo
362	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
363	Positivo	Negativo	$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
364	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
365	Positivo	Negativo	$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
366	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
367	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
368	Positivo	Negativo	$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
369	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
370	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
371	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
372	Positivo	Negativo	$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
373	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
374	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo

375	Positivo	Positivo		Positivo
376	Positivo	Negativo	$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
377	Positivo	Negativo	$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
378	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
379	Positivo	Negativo	$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
380	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
381	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
382	Positivo	Positivo		Positivo
383	Positivo	Negativo	$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
384	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
385	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
386	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
387	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
388	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
389	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
390	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
391	Positivo	Negativo	$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
392	Positivo	Positivo		Positivo
393	Positivo	Negativo	$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
394	Positivo	Positivo		Positivo
395	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
396	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
397	Positivo	Positivo		Positivo
398	Positivo	Negativo	$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
399	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
400	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
401	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
402	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
403	Positivo	Negativo	$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
404	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
405	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
406	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
407	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
408	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
409	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo
410	Negativo		$\geq 3,5\text{mg/L}$	Negativo

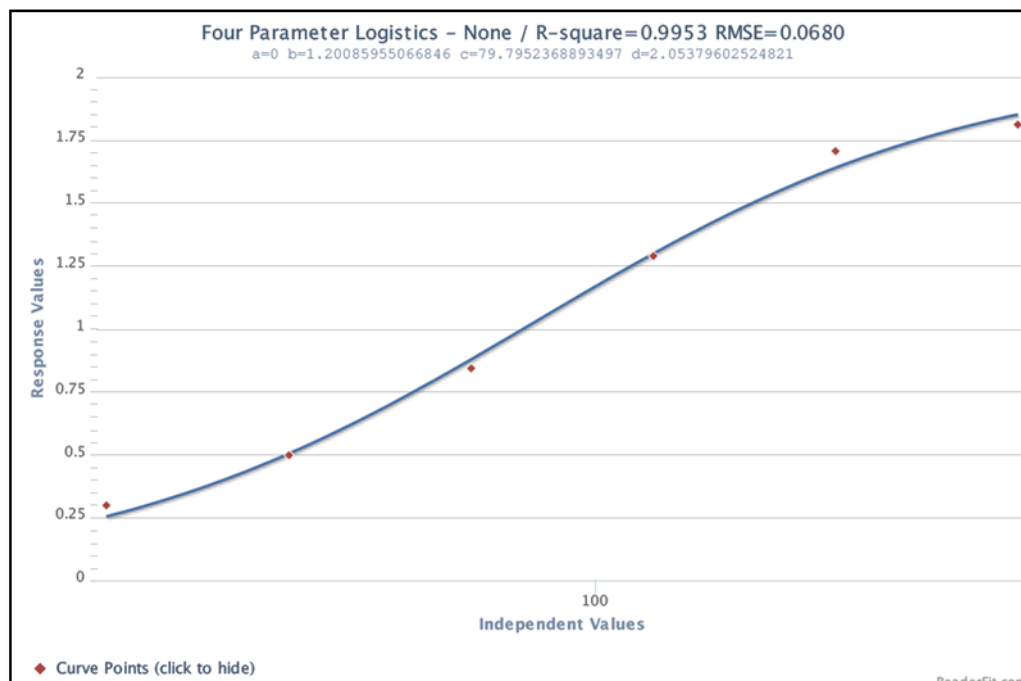
***NA** – Não aplicável (o indivíduo respondeu ao inquérito, mas não quis realizar a colheita do fluido oral).

Anexo 7: Curvas Padrão pelo Modelo de Regressão Logístico de Quatro Parâmetros

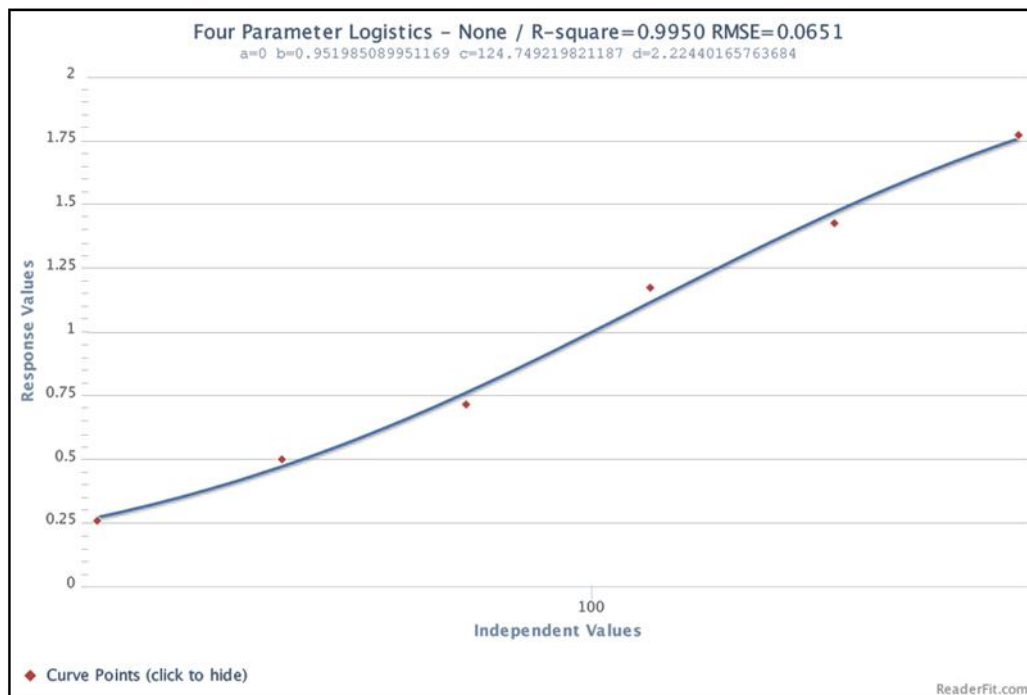
1. Ensaio Experimental 1



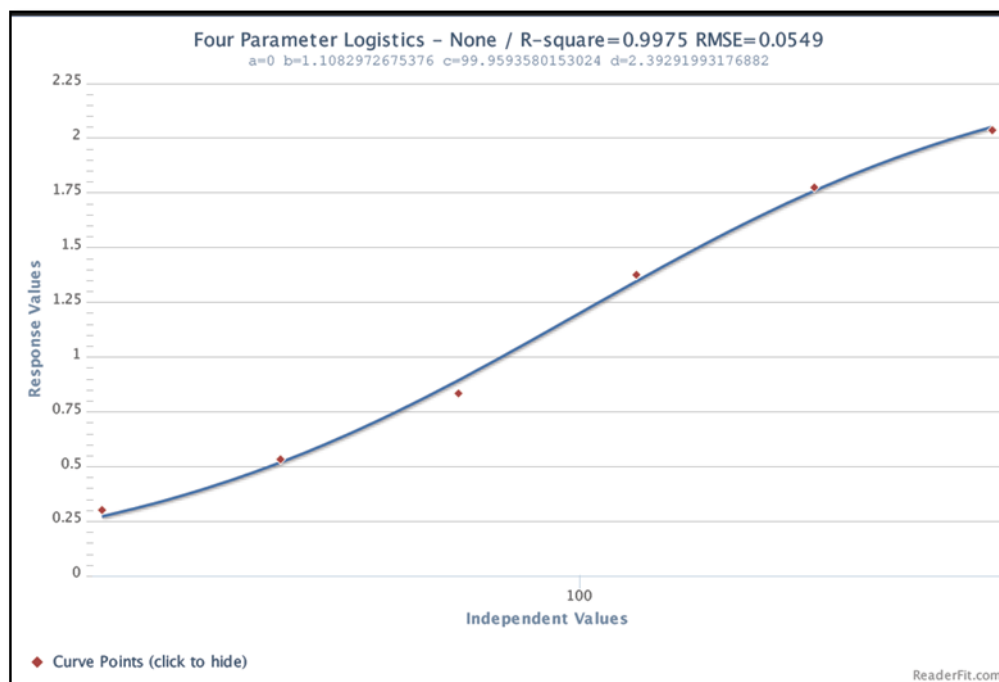
2. Ensaio Experimental 2



3. Ensaio Experimental 3



4. Ensaio Experimental 4



Anexo 8: Sequências Nucleotídicas Editadas

Sequência correspondente ao clone 13D

CCAGCGATGAACTTTATCACTGTGACACTTGAGGGGAATGAAATCGTTGCCGATGGCTTGCGTTTGA
CAGTGCCAGAAGGAACGCTGAAAGTTCTGCGTGAGAAGGGTTATGACGGCAAGAAATTGATCTTCGG
TATTCGTCCAGAAGACATCAATACAGAACCTGCCTTCTTAGAGACCTTCCCAGATTCTGTGGTTTCAT
GCGACCATCTCTGTCTCTGAGCTTTTGGGTTCTGAGTCTCACCTTTACTGCCAAGTTGGTGATAGCG
AGTTTATCGCACGGGTAGATGCTCGTGACTACTCAGAAACAGGTGCAGGTATTGACCTTGGTTTTGA
CCTGAACAAGGCGCATTTTCTTTGATTTTCGAAACAGAGAAAACAGTTTATTAAATATGAGTTTAAAA
AAGATAGTCAGCAAGCCAAACGGAATACATTTGGTCTGCGGACTATCTTTTCTTTATTTTGTCTTTTC
CGTTAAGAATGGTAGCAGCAATGGTCACTTGGGTGAGGTGAGTCCAGTCGATCTGGTCTTGCTCGAC
ATGAAAGAGCAGCGGTGTCATTGCTAAAAGAGCTGTTTCGGCTTTTCGGCAGTCAAGGACTGGCTGGAC
TCGACAGTAATCTCGGAGATTACATCGAAGTGCTCCTGGAATGACGGGATGA

Sequência correspondente ao clone 13F

CCCAGCGATGAACTTTATCACTGTGACACTTGAGGGGAATGAAATCGTTGCCGATGGCTTGCGTTTGA
ACAGTGCCAGAAGGAACGCTGAAAGTTCTGCGTGAGAAGGGTTATGACGGCAAGAAATTGATCTTCG
GTATTCGTCCAGAAGACATCAATACAGAACCTGCCTTCTTAGAGACCTTCCCAGATTCTGTGGTTCA
TGCGACCATCTCTGTCTCTGAGCTTTTGGGTTCTGAGTCTCACCTTTACTGCCAAGTTGGTGATAGC
GAGTTTATCGCACGGGTAGATGCTCGCGACTACTCAGAAACAGGTGCAGGTATTGACCTTGGTTTTG
ACCTGAACAAGGCGCATTTTCTTTGATTTTCGACACAGAGAAAACAGTTTATTAAATATGAGTTTAAA
AAAGATAGTCAGCAAGCCAAACGGAATACATTTGGTCTGCGGACTATCTTTTCTTTATTTTGTCTTTT
CCGTTAAGAATGGTAGCAGCAATGGTCACTTGGGTGAGGTGAGTCCAGTCGATCTGGTCTTGCTCGA
CATGAAAGAGCAGCGGTGTCATTGCTAAAAGAGCTGTTTCGGCTTTTCGGCAGTCAAGGACTGGCTGGA
CTCGACAGTAATCTCGGAGATTACATCGAAGTGCTCCTGGAATGACGGGATGA

Sequência correspondente ao clone 44G

CCAGCCACCAACCAAAGCCAGTCGAGAGGGTCGGTACTCTTTTGTCTTTTTCGGTTTCTTATGCCTT
CTCTCATTTTGTCTAAAGAATGAGATGAAAAATCCCAAAGGCATTAGTACACCCCAGCCTATCCAAGA
GTATTTTCGGATAATAATCTGTGGCGAGCATCACAATTGTACAATCCCCGAAAGGACGATCAGTACA
CTCCAAAAGATAAGAAAGAAGCCGTTTTCTTCATACTTTTGTCTTTCTTTGACGGATGATATCTTGAA
TAATCTTCAAGCTATCGACAGGTTGTAGTTCATGATGATATAGATTAAAAGATTTTAAATACGCTG
CAAAGATAAATAAGTTTATTTTATAAACCAATATTTTTTAAAATATTTTTCATAGGTATTTAAAAA
AAAGTTATAATAAATTGATATTCACATATTTATATAAAAATGTTGTAAAGAAGATTTTCGGAAACGA
GAAAAGGCTATCCAAAGAACTTTTCGGACAGCCTCTTTTGTATATAAGTTCTTGATTTTTATGATT
GTAGTATCTTCGCTATGAATAGGGGTTCTGCCAACTAACCATTAATCTTACTTCCATCGTATTTGTT
AGCTTTCACACAGGATAGGTCAAAGTTCTGAAAGCTCTTCATATAGTTGGCAATGGTTGTGCCATTG
GCATCGGCTAATACATTTTTGC

Sequência correspondente ao clone 44H

ATTGCCTGAATGGGCAGATCTTGAAGTCGATGAAGAAATCATTGACGATGCAAAACCTGAATTTGTA
AAAAAGGTGGCTGATCCGATTAATAATCTGAAAGGTGAAGAATTGCCAGTTTCTGCATTTTATAGGAC
GTGAAGACGGAACATTTGGGCATGGAACGGCAAATTATGAAAAAAGGGGAATAGCAGATGAAGTGCC
AGAATGGCAGCCTGATATGTGTATTGAGTGAACCAATGTGCTTATGTGTGTCCACACGCTGTAATT
CGTCCTTTCTGATTGATGAGGAAGAAATGGCAAAAGCT

Sequência correspondente ao clone 44J

CCAGCGGAGTCCCAATTCTTGACGGTCAGCAAAGAGTACAGCACGTTGTACATCGCCGATAAAGGCT
 TTAGCTTCACCAGCTACACCAAGCATTGTATCAGCAACTACGAATACTGGATGACCAAGGAAGGCTT
 TGCCTGATGCAGAAACAATAGAGTCCTGGAGCAAGTAGCGACCATTCTTGTCTTTCAAAGTGTCCAA
 TTTTGGTAAAAGCTTTGAGAGACTACGAATGACACGTTGTAAGCTGGATCGAGGTCAACATTCAAA
 ATAGCCTTGATTGCATCCAAGTCTGCTGCTTGTTTTCTTCAAAGGTTTTCAAATAGTACCGATCA
 CATCATTTGTAGTGTTAACCTTAATTTGATTAGCTGCTTCAGCAACAATTGCAAGCAAGTCAACATC
 AGCATCGTCAATCGCTTCTTGCGAAAGCGGGATAGCTCCACGGTAAGTCTTAACTTTCCAAGCAACG
 TCTGTGAATTCTGGTTTAGCAAGAGCTGGATTCTTTTCCAGTTCTTCTACGCTTGCCATTTTAGACG
 TAGCGTGTTTAAGAATCGGATATGGCCCTTCAC

Sequência correspondente ao clone 44N

AGGAGAGCTAGAGGACAAGCTATGGGAATTACTCTAGAAAATGTGAGCTTTACCTATCAAGAGGGGA
 CTCCCCTATCTTCATCAGCTCTGACTGATGTTTCCTTGACGATTGAGGACGGCTCCTATACAGCTTT
 GATAGGACATACAGGTAGTGGAAAATCGACGATTTTACAGCTTTTAAATGGCCTATTGGTTCCAAGT
 AAGGGTTCTGTTTCGAGTTTTCGATACTGTCATTACTCCTACATCAACCAATAAAGAAATTCGCCAGA
 TTCGAAAGCAAGTCGGTCTAGTGTTTCAATTTGCTGAAAATCAGATTTTCGAAGAGACTGTTTTGAA
 AGACGTTGCGTTTGGACCACAAAATTTTGGAGTTTCTGAGGAGGAAGCCAAGAAAATTGCGCGTGAA
 GAGTTAGCCTTGGTGGGCATTGATGAGTCACTCTTTGAGAGGAGTCCATTTGAACTTTCGGGTGGTC
 AGATGAGACGTGTGGCTATAGCAGGGATGCTAGCGATGGAGCCTACTGTCTTGG